

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Chemie se zaměřením na vzdělávání



Zuzana Osifová

Interakce materiálu očních protéz s proteiny
Interactions of prosthetic material with proteins

Bakalářská práce

Vedoucí práce:

Prof. RNDr. Jiří Hudeček, CSc.

Praha 2018

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité citační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10. 5. 2018

.....
Zuzana Osifová

Poděkování

Ráda bych poděkovala prof. RNDr. Jiřímu Hudečkovi, CSc., za vedení mé bakalářské práce. Děkuji mu za nekončící trpělivost, se kterou ke mně vždy přistupuje, a za časté diskuse, cenné rady a podporu.

Dále bych chtěla poděkovat Ronaldu Szarvasovi za zhotovení experimentálních destiček a cenné konzultace, které mi poskytl. Dále pak Anně Ammerové a Matúši Kolárikovi za pomoc v mých laboratorních začátcích a za poskytnutí rad a podpory, a pedagogům Gymnázia Jana Nerudy, školy hlavního města Prahy, kteří mi věnovali čas ve svých vyučovacích hodinách potřebný k vyplnění dotazníku pro mou bakalářskou práci.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat své rodině, která mě vždy podporuje a stojí při mně.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá tematikou očních protéz. Problematika je v práci široce rešeršně zpracována. Důraz je kladen na adsorpci proteinů na syntetický povrch.

Experimentální část práce je zaměřena na adsorpci lysozymu na polymethylmethakryátovou destičku. Adsorpce proteinu na materiál byla nižší než stanovený limit detekce. Podle experimentálních dat byla tato hodnota nižší než $5,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

V rámci práce bylo provedeno i orientační šetření ohledně znalostí studentů středních škol o problematice očních protéz. Z výsledků vyplývá nepatrně větší informovanost u studentů zaměřených spíše přírodovědným směrem.

Abstract

This bachelor thesis deals with the problem of ocular prostheses. This problem is in thesis widely researched. Emphasis is placed on protein adsorption onto synthetic surface.

Experimental part of the thesis focuses on lysozyme adsorption onto polymethylmethacrylate surface. Protein adsorption was lower than the specified limit of detection. According to experimental data was this amount lower than $5,37 \mu\text{g}/\text{cm}^2$.

In the thesis was conducted survey on secondary education students' awareness of ocular prosthesis. The results show slightly greater awareness of science-oriented students.

Klíčová slova

Oční protéza, eviscerace, orbitální implantát, radikálová polymerizace, adsorpce proteinů, lysozym, stanovení proteinů.

Key words

Ocular prosthesis, evisceration, orbital implant, radical polymerization, protein adsorption, lysozyme, protein assay.

Obsah

1.	ÚVOD	9
2.	CÍLE PRÁCE	10
3.	TEORETICKÁ ČÁST	11
3.1	Anaplastologie	11
3.2	Anatomie a fyziologie lidského oka.....	11
3.3	Indikace k odstranění oka z očníce a jeho provedení.....	13
3.4	Oční protéza a orbitální implantát.....	14
3.5	Materiály využívané k výrobě očních protéz	16
3.5.1	Skleněné oční protézy	16
3.5.2	Akrylátové oční protézy	17
3.5.3	Výroba oční protézy ze syntetických pryskyřic	18
3.6	Polymethylmethakrylát jako materiál k výrobě očních protéz.....	20
3.6.1	Degradace polymethylmethakrylátu	21
3.7	Radikálová polymerizace	22
3.8	Oční protéza a interagující proteiny	27
3.9	Adsorpce proteinů	28
3.10	Proteiny lidských slz	32
3.11	Hygiena oční protézy a očního důlku.....	36
3.12	Psychologie ztráty oka	37
3.13	Žák se zrakovým postižením.....	38
3.14	Metody spektrofotometrického stanovení proteinů.....	39
4.	MATERIÁLY A METODY	43
4.1	Materiál	43
4.2	Metody	43
4.3	Dotazníkové šetření.....	44
5.	PRAKTICKÁ ČÁST.....	46
5.1	Výsledky stanovení adsorpce lysozymu	46
5.2	Výsledky pilotního šetření na gymnáziu.....	49
6.	DISKUSE.....	55
7.	ZÁVĚR	56
8.	SEZNAM LITERATURY	57

SEZNAM ZKRATEK

Ala	alanin
Arg	arginin
Asn	asparagin
Asp	asparagová kyselina (aspartát)
BCA	bicinchonová kyselina
BzO	benzoyloxy skupina
c _{LYZ}	koncentrace lysozymu
Glu	glutamová kyselina (glutamát)
H _{α₁} AG	lidský orosomukoid
H _{α₁} AT	lidský α ₁ -antitrypsin
HHT	lidský holotransferin
HIgG	lidský imunoglobulin G
HSA	lidský sérový albumin
Ile	isoleucin
LOD	limit detekce
LOQ	limit kvantifikace
Me	methyl
PE	polyethylen
PEG	polyethylenglykol (nebo polyethylenoxid v biochemických textech)
PEO	polyethylenoxid
PES	syndrom fantaskního oka
Phe	fenylalanin
PMMA	polymethylmethakrylát
Sb.	sbírka
Ser	serin

Trp	tryptofan
Tyr	tyrosin
UHMWPE	ultra vysoce molekulární polyethylen

1. ÚVOD

Ztráta oka musí být pro člověka velice obtížnou životní situací, se kterou se nelze vyrovnat okamžitě. Zúžení zorného pole, narůstající obavy o zdraví druhého oka a strach z reakce okolí – to je jen kratičký výčet limitujících skutečností, kterým musí pacienti čelit. I přes tato omezení mezi nimi nalezneme herce, politiky, tanečníky nebo sportovce.

Je pravděpodobné, že většina čtenářů této práce dokonce viděla film s jednookým hercem nebo sportovní utkání s jednookým hráčem, přesto však nikdo nic nezpozoroval. To je zásluha stále se vyvíjející technologie výroby očních protéz.

Oční protéza je estetická náhrada chybějícího oka, zhotovená ze skla nebo syntetické pryskyřice. V dnešní době dosahují tyto protézy takové kvality, že nelze rozeznat protézu od zdravého oka nejen v televizi, ale ani při osobním kontaktu.

Svou bakalářskou práci jsem zaměřila na představení tématiky očních protéz širší veřejnosti a to primárně z toho důvodu, jak moc je toto téma ve společnosti okrajové, ačkoliv není kontroverzní ani tabu. Myslím si, že širší povědomí u tématu ve společnosti by mohlo vést k větší otevřenosti pacientů, kteří se často zdráhají se svým omezením svěřit.

Teoretická část mé práce představuje oční protetiku jako multidisciplinární obor a na její aspekty je nahlíženo z anatomického, (bio)chemického i psychologického hlediska. Kapitola je zaměřena především na přehled problematiky očních protéz, na výrobu oční protézy, mechanismus radikálové polymerizace syntetické pryskyřice a adsorpci proteinů, která hraje zásadní roli v interakci živé tkáně a umělého materiálu.

Praktická část mé práce sleduje výsledky nově navrženého experimentu, který měl zhodnotit odolnost polymethylmethakrylátu vůči adsorpci lysozymu na vlastní povrch. Dále je zaměřena na vyhodnocení dotazníku, který sleduje povědomí o tématice očních protéz mezi studenty gymnázia.

2. CÍLE PRÁCE

Primárním cílem mé bakalářské práce je vytvořit ucelený soubor poznatků o tématice očních protéz. Hlavním cílem je vytvořit koherentní text, který by poskytoval snadnou orientaci v tomto tématu.

Hlavním výzkumným záměrem mé práce je experimentální zhodnocení odolnosti destičky zhotovené z polymethylmethakrylátu medicínské kvality vůči adsorpci lysozymu na její povrch. Praktická část obsahuje přesný protokol z prováděného experimentu a jeho výsledky.

Druhým výzkumným záměrem je posouzení a prověření znalostí studentů pražského gymnázia v oblasti oční protetiky. Podle vypracované hypotézy se očekává větší povědomí o problému u studentů zaměřených spíše přírodovědným směrem, a cílem je hypotézu zhodnotit na základě experimentálních dat.

3. TEORETICKÁ ČÁST

3.1 Anaplastologie

Úrazy s trvalými následky, nemoci nebo vývojové vady jsou nedílnou součástí každodenního života lidské populace. V dřívějších dobách byly trvalé následky po úrazu (ztráta oka, poranění kůže, poranění v obličeji) na člověku nepřehlédnutelné. Dnes však řada protéz a implantátů působí natolik přirozeně, že jsou laikem téměř nerozeznatelné, což nemocným velmi usnadňuje návrat do každodenního života.

Termín anaplastologie je řeckého původu (ana – *znovu*; plastos – *vytvořeno*) [1]. Jedná se o odvětví medicíny, které se specializuje na návrh, výrobu a aplikaci vysoce realistických protetických prostředků, jako je například i oční protéza. Jejím cílem je specifikace a studium materiálů, ze kterých jsou tyto prostředky vyráběny. Často bývá označována i za řemeslo, ve kterém se snoubí umění se špičkovou vědní technikou [1].

V dnešní době musí anaplastologie řešit vysoké nároky společnosti, hlavně co se týče přijatelného kosmetického vzhledu protetických prostředků. Tyto nároky se obecně zvyšují u všech náhrad v obličeji, kde hraje kosmetický aspekt asi nejvýznamnější roli. Kvalita těchto prostředků však v dnešní době dosáhla tak vysoké úrovně, že při běžném kontaktu není možné rozeznat výraznější rozdíl od fyziologického nálezu, a protetické prostředky jsou již schopny plně konkurovat vzhledu původních tkání [2].

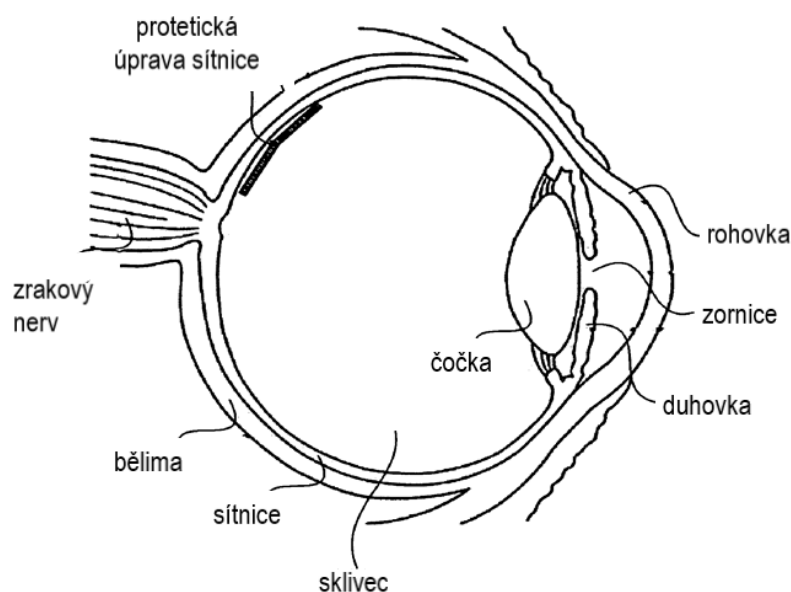
Z historického hlediska sahají kořeny anaplastologie do antických časů [3]. Nárůst pacientů zaznamenává anaplastologie po válečných konfliktech, kdy pochopitelně poptávka po protetických prostředcích roste v důsledku zranění.

3.2 Anatomie a fyziologie lidského oka

Ztráta zraku na jednom oku může být pro člověka značně limitující, protože právě zrakem člověk získává až 80 % všech informací o svém okolí. Z tohoto důvodu byla vyvinuta řada chirurgických metod, jak zrak člověku vylepšit, nebo alespoň zachovat. Mezi nejznámější operace patří implantace nitrooční čočky [4] a transplantace rohovky [5]. V dnešní době se velmi rychle vyvíjejí i metody transplantace sítnice nebo implantace smyslových buněk (Obr. 1, str. 12). Tyto metody mohou odvrátit úplné oslepnutí pacienta.

Lidské oči jsou párový orgán a řadí se mezi nepohyblivější části lidského těla. Obecně se lidské oko rozděluje na tzv. oční kouli, která je chráněna lebkou, a tzv. přídatné orgány oční. Do této skupiny se řadí oční víčka, spojivka, slzní žláza a okohybné svaly [6].

Základní anatomie a fyziologie oka je shrnuta níže. Shrnutí vychází z anatomie a fyziologie oka, jak ji popisuje Montalbo [7] a Dylevský [6].



Obrázek 1: Oční koule. Upraveno podle [7].

Zrakový nerv přenáší zrakovou informaci ze sítnice do zrakových center v mozku. Někdy je označován jako II. hlavový nerv.

Bělima (*sclera*) je vazivová blána a slouží jako ochrana vnitřních struktur oka. V přední části oka přechází v rohovku. Rohovka (*cornea*) je čirá zakřivená vrstva pokrývající přední část oka. Zajišťuje prostupnost světla na sítnici a jeho správný lom.

Sítnice (*retina*) je tenká vrstva zajišťující snímání a předzpracování světelných signálů. Je tvořena pigmentovými, gangliovými a bipolárními nervovými buňkami. Nedílnou součástí sítnice jsou i vlastní smyslové buňky – tyčinky a čípky. Obr. 1 dokumentuje možnou úpravu sítnice, která může pacientovi uchovat nebo dokonce navrátit zrak [7].

Sklivec (*corpus vitreum*) zaplňuje až 2/3 obsahu oční koule. Je tvořen vodou a malým množstvím proteinů, chloridu sodného a kyseliny hyaluronové.

Čočka (*lens crystallina*) je průhledná bikonvexní struktura v přední části oka, která láme spolu s rohovkou světlo, aby mohlo být zaměřeno na sítnici. Čočka i rohovka jsou v lidském oku plně nahraditelné implantáty.

Duhovka (*iris*) spolu s čočkou odděluje přední a zadní prostor oční koule. Vprostřed duhovky je otvor zvaný zornice (*pupilla*).

3.3 Indikace k odstranění oka z očníce a jeho provedení

V některých případech ale pouhá náhrada jedné oční struktury (transplantace rohovky, náhrada čočky nebo bionická úprava sítnice) jako řešení pacientova problému nestačí. Tehdy může být indikováno i úplné odstranění oka. Nejběžnější indikací k odstranění oka z očníce je tvorba nádoru nebo tumoru, úrazy [8] (mechanické poškození, popálení, poleptání, zásah elektrickým proudem) nebo glaukom, atrofie oka či profylaxe sympatické oftalmie tj. „soucitého onemocnění“ [9]. Při něm poškození jednoho oka vyvolá autoimunitní granulomatózní zánět proti proteinům cévnatky (*uvey*) a imunitní systém následně napadá i druhé, zdravé oko. To vede k rapidní změně nitroočních struktur a ke slepotě. Po vypuknutí autoimunitní reakce již není léčba možná ani s použitím masivních imunosupresiv [10].

K odstranění oka z očníce se využívají převážně dvě operační metody a to enukleace a eviscerace [9].

Při enukleaci dochází k odstranění celé oční koule, která se odřezává od zrakového nervu. Enukeace je prováděna při léčbě objemných očních nádorů a tumorů (retinoblastom) [11].

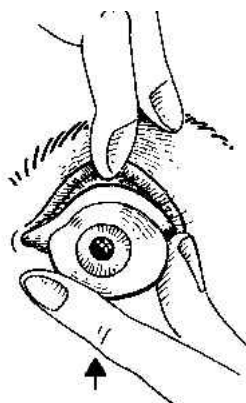
Eviscerace je běžnější zákrok, kdy dochází k odstranění pouze rohovky a nitroočních struktur za zachování extraokulárního svalstva a skléry. Zrakový nerv se neodřezává. Eviscerace se doporučuje pacientům se zvýšenou krvácivostí nebo nesnášenlivostí k celkové anestezii. Další výhodou je rozsah zachované tkáně, který podmiňuje lepší kosmetický vzhled rány a pohyblivost oční protézy [12].

3.4 Oční protéza a orbitální implantát

Po úrazu na oku nebo jeho úplné ztrátě je z medicínských i psychologických [3] důvodů doporučováno začít nosit oční protézu, širší veřejností častěji známou jako skleněné nebo umělé oko.

Oční protéza je nejčastěji zhotovena ze skla nebo syntetické pryskyřice a má miskovitý tvar. Vkládá se za oční víčka na zahojenou postoperační ranku, která je oploštěná bělimou a Tenonovým pouzdrem (součástí bělimy chránící oční kouli). Průměrně se oční protéza vkládá na ranku po 6-8 týdnech po operativním výkonu. Vložení oční protézy do spojivkového vaku je schematicky znázorněno na Obr. 2 [13].

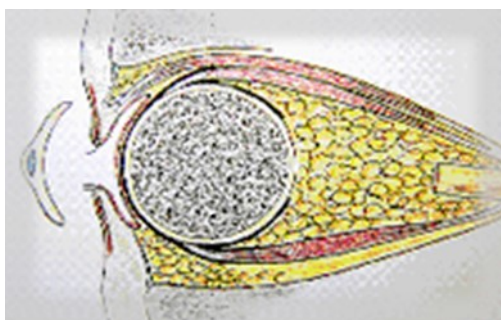
Výsledný tvar protézy je upravován individuálně podle struktury očnice a oploštění pooperační ranky. Také základní barva pryskyřice a barva duhovky jsou zcela individuálně upravovány pro potřeby každého pacienta [13].



Obrázek 2: Schématické znázornění nasazování oční protézy. Převzato z [13].

Oční protéza, kterou na pacientovi vidí okolí, je ale pouze vrchním dílem celkové úpravy očnice při enukleaci nebo evisceraci. Jelikož prostor očnice nemůže zůstat po odstranění nitroočních struktur a eventuálních nádorů prázdný, vkládá se do něj orbitální implantát, který má za úkol udržovat přirozený objem očnice, zabránit propadnutí oční protézy a ve výsledku (jsou-li přítomny oční svaly) zajišťovat i její pohyb. Jedná se o útvar sférického nebo oválného tvaru. Orbitální implantát zašitý do očnice se z těla již nevyjímá. Primárně se orbitální implantáty rozdělují na porézní (integrované) a neporézní (neintegrované) [8][14].

První skupina (porézních) implantátů se vyznačuje tím, že dovolují spojení organické tkáně s vlastním materiálem implantátu. Dochází tedy k prorůstání fibrovaskulární tkáně do struktury implantátu. Díky tomuto faktoru je možné nejen přišít extraokulárních svalů k implantátu, ale i samotné ovlivňování pohybu oční protézy díky tření mezi ní a tkání [15]. Mezi materiály sloužící k výrobě porézních implantátů patří hydroxyapatit, vysokohustotní porézní polyethylen Medpor nebo oxid hlinitý. Všechny materiály jsou velmi dobře snášeny. V případě implantátů z materiálu Medpor se pooperační komplikace vyskytly pouze u 1,66 % pacientů [16].



Obrázek 3: Znárodnění orbitálního implantátu a jeho umístění v očnici.
Převzato z [13].

Neintegrované orbitální implantáty nedovolují prorůstání organické tkáně do vlastní struktury. Aby byla přesto zachována motilita oční protézy, jsou tyto implantáty pokryty vrstvou fixačních materiálů – např. polyesterovou gázou. Toto pokrytí zaručuje přilnutí okohybných svalů k implantátu a následný pohyb protézy. Mezi nejběžnější materiály k výrobě neintegrovaných implantátů patří polymethylmethakrylát (PMMA), sklo a silikonové koule [17].

Oční protéza slouží z hlediska zachování zraku pacienta pouze jako kosmetická náhrada oka, které v obličeji chybí z důvodu nemoci, traumatu nebo vývojové vady. Na rozdíl od vyvíjející se technologie bionického oka není jakýmkoli způsobem schopna zprostředkovat pacientovi zrak, pacient je tedy na straně oční protézy trvale oslepen a má tak omezené zorné pole [3].

Přestože postižené oko zprostředkovávat zrakové vjemy nemůže, jsou pravidelně zaznamenávány případy, kdy pacienti zrakové vjemy na chybějícím oku pocítují. Tato situace se označuje jako PES (Phantom Eye Syndrome). Rozvoj této iluze může korelovat se silnými předoperačními bolestmi oka a hlavy. Tuto bolest mohou pacienti

nadále pociťovat, přestože byl její zdroj již odstraněn. Zrakové iluze jsou vysvětlovány jako důsledek spontánní aktivity ve zrakové kůře. Tento syndrom je velmi podobný s fantomovou končetinou, kdy má pacient pocit, že amputovaná končetina je stále připevněna k tělu. PES se vyskytuje až u 78 % pacientů [18].

V očním důlku ale protéza slouží nejen k zachování přijatelného vzhledu tváře, který je velmi důležitý pro psychiku pacienta, ale zejména jako opora pro víčka a okohybné svaly, které si tak zachovávají svou funkci. Díky aplikaci oční protézy se zachovává i úloha slzních kanálků, které napomáhají ránu čistit a snižují tak riziko infekce [19].

3.5 Materiály využívané k výrobě očních protéz

Uvádí se, že raným materiálem k výrobě očních protéz bylo zlato pokryté glazurou. Obecně panuje názor, že první oční náhrady zhotovili starověcí Egypťané, kteří je však používali v sochařství a mumifikaci. Teprve v devatenáctém století se začaly vyrábět skleněné oční protézy ve Francii a v Německu. Zakladatelem věhlasné oční protetiky v německém městě Lauscha je Friedrich Adolf Müller. V dnešní době skleněným protézám konkurují protézy akrylátové [3].

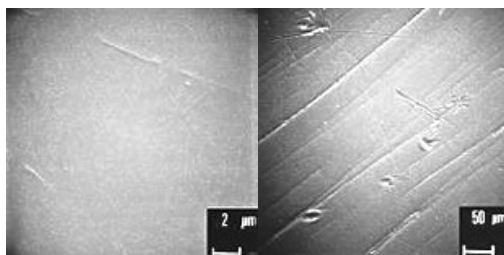
U všech materiálů sloužících k výrobě protetických prostředků je zapotřebí ověřit jejich zdravotní nezávadnost.

3.5.1 Skleněné oční protézy

Kryolitové sklo, používané již Müllerem, se vyznačuje především hladkostí svého povrchu, na kterém se nenacházejí žádné výraznější výčnělky nebo rýhy. Na rozdíl od kryolitového skla jsou na protéze z akrylového materiálu patrné výraznější rýhy, které jsou způsobeny jejím leštěním [13]. Situaci názorně dokumentuje Obr. 4 (str. 17). Na skleněné protéze nejsou zdaleka takové povrchové defekty, ačkoliv je snímek v 25násobném zvětšení [13].

Sklo je pro výrobu oční protézy vhodné i díky své smáčivosti, která umožňuje, na rozdíl od komerčně dostupných syntetických materiálů, aby slzy vytvořily film po celém povrchu protézy. Díky tomuto filmu je chráněna spojivka a protéza vypadá přirozeněji [19]. Největší nevýhodou skleněné protézy je její křehkost a možnost rozbití,

které v sobě skýtá nebezpečí úrazu očního důlku. Kromě rozbití protézy při běžné manipulaci (například při jejím čištění), se může skleněná protéza rozbit i při sportu nebo pádu. Sklo také obecně hůře snáší teplotní změny a v zimě je oční protéza v důlku až nepříjemně chladná a přimrzají k ní slzy [20].



Obrázek 4: Porovnání hladkosti povrchu nenošené protézy z kryolitového skla (vlevo) a nenošené protézy ze syntetické pryskyřice (vpravo). Převzato z [13].

Tvarově je skleněná protéza nepravidelnější, zpravidla větší než akrylátová a pupila má špičatější tvar, který může působit až nepřírozně. Na povrchu protézy také vystupují bavlněné žilky, kterých je na skleněnou náhradu použito zpravidla více, aby došlo ke ztmavení mléčné barvy kryolitového skla. Příliš jasná barva skléry je nežádoucí hlavně u starších pacientů, u kterých je zvýšená pigmentace bělma naprosto přirozená [21]. Tvar skleněné oční protézy nelze upravovat tak libovolně, jako při použití syntetické pryskyřice.

3.5.2 Akrylátové oční protézy

Z historického hlediska sahají kořeny výroby akrylátových očních protéz do období druhé světové války. Politická situace a válečný stav s Německem nedovoloval dovoz materiálu k výrobě skleněných protéz, a protézy akrylátové tak vznikly jako jejich alternativa [20]. Mezi největší výhody syntetického materiálu patří jeho celková mechanická odolnost, díky které jsou i dnes akrylátové protézy první volbou pro sportovce, děti a starší osoby [13][20].

V dnešní době se oční protézy tohoto typu vyrábějí ze syntetických pryskyřic jako je polymethylmethakrylát a jeho kopolymery, přípravky Superpont[®] nebo Superpont[®] C+B. Akrylátové pryskyřice jsou velice odolné vůči chemickému

poškození (například slzami či slinami), takže nacházejí uplatnění nejen v protetice oční, ale i dentální [22]. Další nespornou výhodou je nízké riziko alergické reakce. Methylmethakrylát může vyvolat senzibilizující reakci s kůží nebo s dýchacími cestami, ale převážně ve svém monomerním stavu, se kterým pacient ve větším množství nepřichází do styku. U polymethylmethakrylátu je pak riziko alergické reakce výrazně nižší [23].

Polymethylmethakrylát a jeho kopolymery jsou dobře tvárné [22], takže tvar akrylátové oční protézy lze dobře uzpůsobit tvaru očnice a je možno jej i po skončení výroby dále upravovat.

Nevýhodou akrylátových očních protéz je jejich hrubší povrch a degradace materiálu. K degradaci může docházet chemickým, mechanickým ale i světelným poškozením oční protézy. Prvním náznakem mechanického poškození je subjektivní dráždění ocní dutiny. Na povrchu oční protézy začínají být patrné zvětšující se tmavé linky (nejčastěji na krajích nebo kolem duhovky), což může vést až k delaminaci materiálu (oddělení jednotlivých vrstev). Světelné poškození protézy se projevuje barevnou nestálostí duhovky [19].

3.5.3 Výroba oční protézy ze syntetických pryskyřic

Následující text je koncipován jako stručný přehled vzniklý porovnáním informací, které uvádějí Raizada a Rani [3], Dürrová [8], Klusoňová [9] a Tošovská [24], a na základě doporučení pro zacházení s přípravkem Superpont® [23].

K výrobě oční protézy se využívají dvě syntetické pryskyřice. První pryskyřice má mléčnou barvu a slouží jako bělmo na výsledné oční protéze. Druhá pryskyřice se nanáší na povrch oční protézy ke konci výroby. Je čirá a zajišťuje lesk protézy.

Základem pro výrobu funkční a pro pacienta pohodlné oční protézy je model otisku pacientovy očnice. Ten se vyzíská použitím otiskovací lžice, případně si pacient může vyzkoušet již dostupné modely. Podle modelu se vyrábí sádrový odlitek, nejčastěji z alabastrové nebo modelovací sádry.

V průběhu tuhnutí sádry v kyvetě (soudkovité bronzové nádobě sestavené ze dvou dílů) se vyřízne kotouček o průměru 10,5 – 12,5 mm se středovým otvorem 3 mm (nejčastěji z acetátu celulosy). Tento kotouček bude na finální protéze představovat duhovku s pupilou. Barvení duhovky patří k nejnáročnějším operacím v průběhu celé

výroby. Primárním cílem je shoda s kontralaterálním okem, aby nebylo možné rozpoznat rozdíl od fyziologického nálezu. Používané barvy musejí být co nejvíce barevně stálé, nejčastěji se jedná o barvy akvarelové nebo olejové vmíchané do polymethylmethakrylátového média. Na spodní stranu kotoučku se nanáší základní barva (ta co je na oku nejtmavší) a ze svrchní strany se domalují barvy tkáně. Tato metoda zlepšuje dojem plasticity duhovky.

Korneální (rohovkový) knoflík se k duhovkovému disku připojuje kyanoakrylátovým lepidlem.

Po vyjmutí sádrového odlitku z kyvety je vzniklá forma jemně opravena modelovacím nožem a potřena izolačním přípravkem, aby nedošlo ke smísení syntetické pryskyřice a sádry. Do formy se umístí duhovková destička a zalije se připravenou pryskyřicí. Pryskyřice se připravuje smísením kapalného monomeru s perličkovým polymerem v poměru stanoveném výrobcem (u pryskyřice Superpont[®] od výrobce SpofaDental to je v objemovém poměru perličkový polymer: monomer 3:1) [23]. Hmotu je zapotřebí dokonale rozmíchat, aby se nevytvářely bublinky, které mohou negativně ovlivnit kvalitu výrobku. Následně je reakční ná sada nalita do sádrové formy, kyveta se uzavře a nechá se cca 20 minut odpočinout ve vertikální poloze.

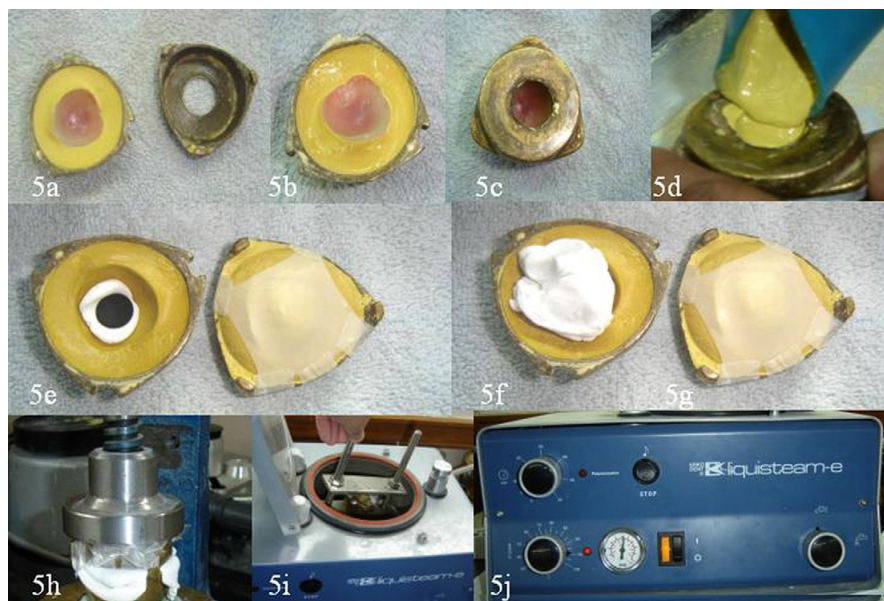
Polymerizace probíhá v tepelně - tlakovém polymerizátoru s vodní nebo glycerolovou lázní za tlaku 4 bar. Teplota se udržuje na hodnotě 65 °C po dobu 90 minut. Dalším zahříváním lázně se během 30 min dosáhne teploty 100 °C, která je dalších 30 min udržována. Celková doba polymerizace je 2 h 30 min. Po jejím skončení se doporučuje nechat výrobek přirozeně vychladnout a teprve poté vyjmout z kyvety.

Po vytvrzení materiálu je protéza barevně tónována. K simulaci očních žilek se využívá bavlněných červených nitek a k celkovému ztmavení odstínu bělimy je možné použít přírodní pigmenty. Následně je forma naplněna transparentní syntetickou pryskyřicí tvořenou polymethylmethakrylátem, methylmethakrylátem a dimethakrylátem. Polymerizace probíhá při 100 °C po dobu 1 hodiny. Po ukončení výrobního procesu je protéza vyleštěna bavlněným kotoučem a případně domodelována, aby co nejlépe plnila svou kosmetickou funkci.

Pro dokonalé odstranění monomeru z protézy se firmou Heraeus Kulzer GmbH doporučuje ponechat nově zhotovenou protézu ve vlažné vodě po dobu 12 h před umístěním [25].

Vocílka [20] navrhl výrobu očních protéz 3D tiskem. Tato metoda má zaručit naprostou shodnost duhovky umělého a kontralaterálního oka. Zdravé oko se naskenuje

kamerou do počítače a jeho přesná kopie se vytiskne. Jádru prototypu je následně zalito biokompatibilním polymethylmethakrylátem. Výsledná oční protéza by měla být levnější [20].



Obrázek 5: Výroba oční protézy ze syntetické pryskyřice. Převzato z [3].

3.6 Polymethylmethakrylát jako materiál k výrobě očních protéz

Pryskyřice Superpont[®] je distribuována ve formě prášku (perličkového polymeru) a kapalného monomeru (99 hm. % methylmethakrylát). Prášek se skládá z polymethylmethakrylátu, methylmethakrylátu, pigmentů, stabilizátoru (hydrochinon) a asi 1 hm. % iniciátoru (dibenzoylperoxid) [23].

Polymethylmethakrylát **2** (Schéma 1, str. 21) je termoplastický průhledný syntetický polymer, který je znám spíše jako organické sklo, plexisklo nebo Umaplex. K jeho nejcharakterističtějším vlastnostem patří čírost, kterou si zachovává i v silných vrstvách, snadné barvení, tvárnost, až 99% propustnost pro světlo a vysoká stálost proti atmosférickému poškození. Z těchto důvodů nachází široké uplatnění nejen v lékařství, ale zejména ve stavebnictví, spotřebním průmyslu, elektrotechnice nebo bižuterii [22][26].

V lékařství je významné použití hydrogelů odvozených od methakrylových esterů obsahujících v postranním řetězci minimálně jednu hydroxylovou skupinu.

Kopolymery 2-hydroxyethylmethakrylátu **3** a 0,3% ethylendimethakrylátu **4** jsou mimořádně dobře snášeny živou tkání a používají se tak pro výrobu kontaktních čoček i jiných protetických pomůcek [22].

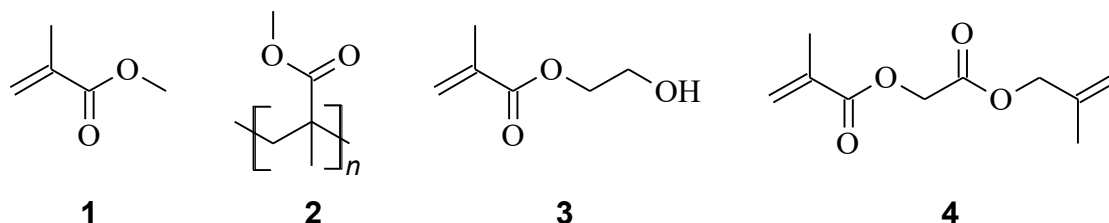


Schéma 1: Příklady sloučenin využívaných k výrobě protetických materiálů.

Vytvořeno podle [22].

3.6.1 Degradace polymethylmethakrylátu

Na degradaci polymerů se podílí převážně povětrnost – souhrn mnoha faktorů, které působí buďto samostatně, nebo častěji v kombinacích. Mezi nejdůležitější faktory povětrnosti patří sluneční záření, styk s kyslíkem nebo ozonem, změny teploty a vlhkosti, a nečistoty přítomné v atmosféře [22]. Z výše uvedené charakteristiky je zřejmé, že degradace téhož materiálu bude na různých místech odlišná.

Oční protézu je doporučeno před přímým slunečním světlem chránit tmavými brýlemi, protože sluneční záření urychluje vyblednutí barvy na duhovce a dochází pak k barevnému odlišení protézy a druhého oka [19]. Samotný polymethylmethakrylát je proti poškození UV-zářením odolný, přestože obsahuje absorbující karbonylové skupiny. Tyto skupiny totiž u řady polymerů způsobují fotoaktivaci, vznik volných radikálů a poničení řetězce. Stálost polymethylmethakrylátu se doposud nepodařilo úplně vysvětlit [22].

Teplotní výkyvy vyvolávají u řady polymerů rozměrové změny, které mohou někdy vést až ke vzniku trhlinek v materiálu. Z tohoto důvodu popisují pacienti v zimních měsících oční protézu jako bolestivou při prudké změně teploty [20], nejčastěji tedy při vstupu do zatepleného prostoru. U skleněných protéz reálně hrozí jejich prasknutí.

3.7 Radikálová polymerizace

Přeměna methylnmethakrylátu na medicínsky využitelný polymethylnmethakrylát probíhá mechanismem radikálové polymerizace. Díky široké využitelnosti polymethylnmethakrylátu je jeho výroba detailně zpracovaná jak z chemického, tak i z fyzikálního hlediska. Ve své práci uvádím jen stručný přehled mechanismu polymerizace methylnmethakrylátu tak, aby byl tento text vhodný i pro didaktické účely. Obsírněji je tato problematika, včetně reakční kinetiky, zpracována v literatuře uvedené v seznamu referencí jako [22] a [27].

Konkrétní uzpůsobení polymerizačních podmínek záleží na typu výsledného produktu (výroba desek, trubek). Pro aplikaci výsledných produktů v medicínské praxi je významné tzv. polymerační lití. Jedná se o polymerizaci v monomerní fázi, která probíhá v rotující formě. Touto metodou se z 2-hydroxyethylmethakrylátu **3** vyrábějí kontaktní čočky. Na rozvoji této metody má zásluhu i česká chemie, reprezentovaná především profesorem Ottou Wichterlem [26][28].

Podle mechanismu se radikálová polymerizace řadí mezi řetězové polyreakce tzn. reakce, které sestávají z několika dílčích kroků – iniciace, propagace, přenosové reakce a terminace [27].

Rychlost polymerizace se vyjadřuje změnou látkového množství monomeru přeměněného na polymer za jednotku času. Rychlost polymerizace může být stanovena úbytkem látkového množství monomeru například plynovou chromatografií, nebo změnou objemu reakční směsi při dilatometrické metodě. Dilatometrie vychází z rozdílných hustot polymeru a monomeru, a z následné kontrakce polymerizační násady. Kontrakce je způsobena poklesem mezimolekulární vzdálenosti molekul monomeru při polymerizaci [28].

Iniciace

Aktivním centrem radikálové polymerizace je volný radikál – sloučenina s jedním nepárovým elektronem. Aby se aktivní centrum vytvořilo, musí nejprve dojít k reakci primárního volného radikálu **5** s molekulou monomeru **6** (Schéma 2, str. 23). Příslušný reakční mechanismus je znázorněn pomocí zahnutých šipek.

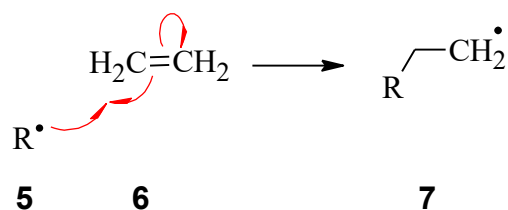


Schéma 2: Tvorba aktivního centra polymerizace reakcí primárního volného radikálu s molekulou monomeru (ethenu). Vytvořeno podle [29]

Pro úspěšnou iniciaci radikálové polymerizace je zapotřebí, aby byl primární volný radikál vhodně stabilní i reaktivní. Vysoce reaktivní, nestabilní, radikály reagují kromě dvojné vazby monomeru i v jiných reakcích, čímž iniciaci a následně i polymerizaci znesnadňují. Naopak silně rezonančně stabilizované radikály nereagují s dvojnou vazbou monomeru vůbec a jsou tak inhibitory polymerizace.

Primární volné radikály v reakční směsi mohou vznikat několika způsoby, nejvyužívanější je přidání iniciátorů tzn. labilních sloučenin, které se za daných podmínek budou rozkládat na primární vhodně reaktivní radikály. Každý monomer a každé reakční prostředí striktně vyžaduje od iniciátoru jiný charakter [27].

Po svém vzniku se primární radikály nechovají zcela nezávisle a mohou mezi sebou interagovat, dochází ke klecovému efektu a ke snížení účinnosti iniciace. Účinnost iniciace f lze vyjádřit rovnicí (3-1) [27].

$$f = \frac{\text{rychlost iniciace}}{\text{rychlost rozpadu iniciátoru}} \quad (3-1)$$

Pryskyřice Superpont[®], obsahuje jako iniciátor dibenzoylperoxid (1 hm. %) [23]. Dibenzoylperoxid **8** se termicky rozkládá na dva benzoyloxy radikály **9** podle Schématu 3.

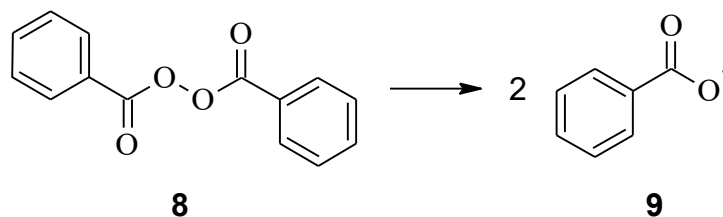


Schéma 3: Termický rozklad dibenzoylperoxidu na dvojici benzoyloxy radikálů.

Vytvořeno podle [27].

Vzniklé benzoyloxy radikály sice mohou začít iniciovat polymerizaci podle Schématu 2, ale také mohou reagovat v dalších reakcích, z nichž nejvýznamnější je tzv. sekundární dekompozice popsaná Schématem 4. Vznik radikálu **10** znesnadňuje průběh polymerizace kvůli jeho odlišné reaktivitě od radikálu **9**.

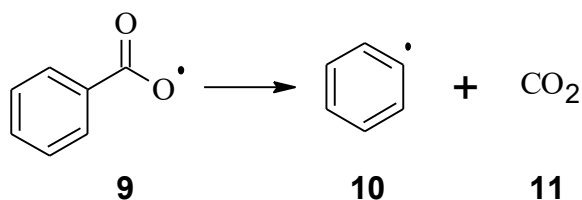


Schéma 4: Sekundární dekompozice. Vytvořeno podle [27].

Při iniciaci polymerizace tepelným rozkladem peroxidů dochází v relativně vysoké míře ke klecovému efektu. Klecový efekt je způsoben výskytem radikálů v těsné blízkosti, ve které je udržují molekuly monomeru nebo rozpouštědla. V takovém případě může dojít k rekombinaci již vzniklých různě reaktivních radikálů za vzniku sloučenin **12** a **13**, které již v polymerizaci nereagují a snižují tak celkový výtěžek iniciace [22] [27].

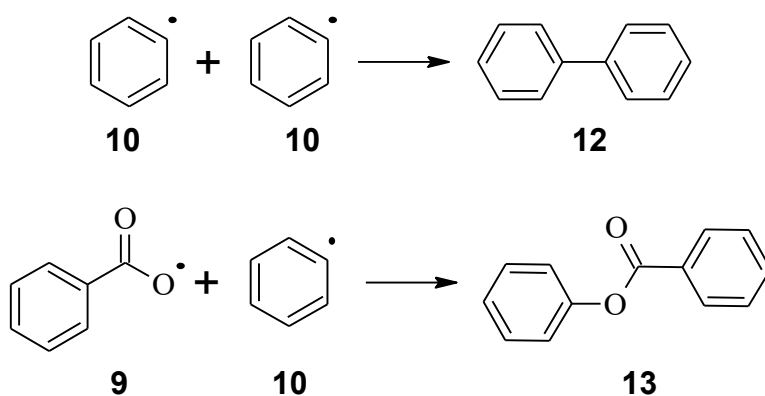


Schéma 5: Reakce klecového efektu, kdy se různě reaktivní radikály rekombinují za vzniku nereaktivních molekul **12 a **13**.** Vytvořeno podle [27].

Další vedlejší reakcí rozkladu dibenzoylperoxidu **8** na produkty je tzv. indukovaný rozpad peroxidů (Schéma 6, str. 25). K této formě rozpadu jsou náchylné hlavně hydroperoxy. V případě dibenzoylperoxidu vzniká po indukovaném rozpadu pouze jeden benzoyloxy radikál a výtěžek iniciace se tím snižuje [27].

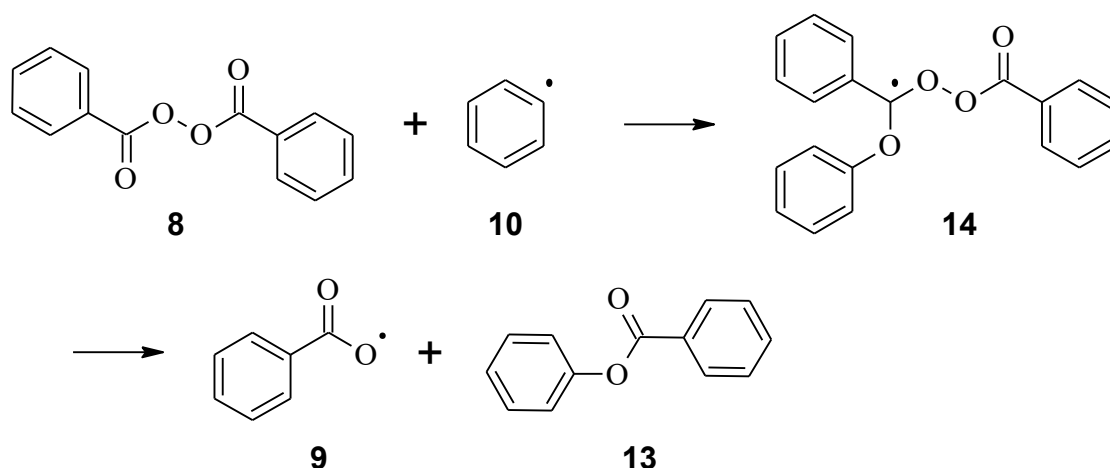


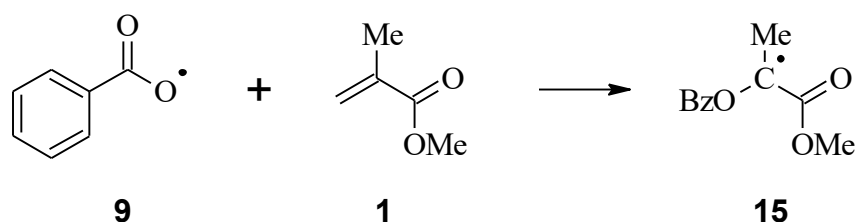
Schéma 6: Indukovaný rozklad peroxidů. Vytvořeno podle [27].

Propagace

Při růstové reakci polymerizace dochází k opakované adici aktivního centra na molekuly monomeru až do té chvíle, kdy se dosáhne žádoucího polymerizačního stupně a reakce je terminována [27][29].

Tvorba růstového centra je tím snazší, čím rezonančně stabilnější růstové centrum vzniká. Mezi nejstabilnější růstová centra patří (díky stabilitě benzylového radikálu) styrenová [29]. Za předpokladu spojování monomerních jednotek ve směru hlava-pata se rezonanční stabilizace růstového centra v celém průběhu polyreakce nemění [27].

Tvorbu růstového centra při tepelné polymerizaci methylmethakrylátu iniciované dibenzoylperoxidem lze vystihnout Schématem 7.



BzO = benzoyloxy skupina

Schéma 7: Tvorba růstového centra 15 v prvním kroku propagační reakce polymerizace methylmethakrylátu 1. Vytvořeno podle [27].

Koncentrace radikálů v reakční směsi se udržuje na velmi nízké úrovni (10^{-9} až 10^{-8} mol/dm³). Při vyšších koncentracích by rychlost propagace vzrostla na tak vysokou hodnotu, že by hrozilo nebezpečí nedostatečného odvádění reakčního tepla z reakční směsi [27].

Přenosové reakce

V polymerní chemii se jako přenos označuje přenesení radikálu z rostoucího řetězce na jinou (makro)molekulu v reakční směsi. Přenosové reakce jsou spojeny s výměnou atomu vodíku nebo chlóru. Radikál se může přenášet libovolně tak, aby vzniklý produkt byl co nejstabilnější; může tedy putovat jak na monomer, polymer, rozpouštědlo, iniciátor nebo i na nečistotu přítomnou v reakční směsi. Látky, které dávají vzniknout velice stabilizovaným radikálům, se označují jako inhibitory, protože zastavují propagační reakci [22][27].

Míra přenosu (relativní přenosová konstanta), C , je obecně dána vztahem (3-2) [27]. Lze ji však vyjádřit pro jakoukoli složku podílející se na přenosové reakci. Jednotlivé relativní přenosové konstanty jsou odlišeny dolním indexem – relativní přenosová konstanta monomeru, C_M , rozpouštědla, C_S , polymeru, C_P nebo regulátoru molekulové hmotnosti, C_R .

$$C = \frac{k_{tr}}{k_p} \quad (3-2)$$

kde k_{tr} je rychlostní konstanta přenosové reakce a k_p je rychlostní konstanta propagace.

Aktivační energie přenosu je vyšší než aktivační energie růstových reakcí a z tohoto důvodu vzrůstá počet přenosových reakcí výrazněji s rostoucí teplotou [27].

Přenos monomerem je u většiny reakcí málo zastoupen (C_M okolo 10^{-5}) a hraje roli pouze u reakcí, kdy vznikají vysoce rezonančně stabilizované radikály, jako je polymerizace propenu nebo allyl-acetátu [27][29].

Jako přenos polymerem se označuje ukončení růstu řetězce, ale zahájení růstu nového z téže makromolekuly. Tímto způsobem vznikají větvené polymery [29]. Pokud větvení dosáhne určitého stupně, může dojít až k zesíťování polymeru, čehož se využívá

i při polymerizaci pryskyřice Superpont[®] a při vytvrzování polyakrylátových pryskyřic [22][23][26][27].

Terminace

Růst polymerního řetězce bývá ukončen po velice krátké době, i v řádu několika sekund. K ukončení růstu a zániku radikálů nejčastěji vede vzájemná rekombinace dvou rostoucích makroradikálů za vzniku jediné makromolekuly. Druhým způsobem zániku radikálů v reakční směsi je disproporcionace, kdy vznikají dvě makromolekuly – jedna s nasyceným koncem a druhá s koncovou dvojnou vazbou [27].

Poměr radikálů zanikajících rekombinací a disproporcionací je dán poměrem rychlostních konstant těchto reakcí. Disproporcionace, spojená s výměnou atomu vodíku, je energeticky náročnější a více závislá na teplotě. Z toho důvodu lze ovlivňovat podíl disproporcionujících radikálů regulací teploty [27].

Terminaci lze navodit i uměle přidáním inhibitorů – látek, které vytvoří velice stabilní radikály a dále již nereagují. Mezi inhibitory patří například chinony, ionty kovů, aromatické polyhydroxysloučeniny nebo aldehydy [23][26].

3.8 Oční protéza a interagující proteiny

Jak již bylo nastíněno v sekci 3.4 *Oční protéza a orbitální implantát*, skládá se operační úprava pacientovy očnice ze dvou klíčových komponent. První z nich je samotná oční protéza překrývající ranku a simulující skutečné oko. Tato protéza přichází do styku s živou tkání vždy po omezený časový interval, který si pacienti volí individuálně. Řádově se interval mezi jednotlivými vyjmutími protézy z důlku pohybuje v desítkách hodin [19].

Další součástí postoperační úpravy očnice je orbitální implantát, který zajišťuje pohyb oční protézy a udržuje přirozený tvar očnice [19]. Tento implantát se z těla pacienta již nevyjímá a je tak v kontaktu s živou tkání nepřerušované i po dobu desítek let.

Není potřeba zdůrazňovat, že materiály, používané k výrobě očních protéz i orbitálních implantátů, musí být lidským tělem dobře snášeny. Snášenlivost látek – převážně materiálů – v biologickém prostředí se označuje jako biokompatibilita.

Některé biokompatibilní materiály (například alumina [30]) jsou současně i bioinertní – nevyvolávají žádnou odpověď organismu. Většina materiálů ale s pacientovým tělem interaguje a může tak vyvolávat i řadu fyziologických odpovědí. Interakce mezi biologickým a syntetickým objektem je zprostředkovávána především proteiny, které se na povrch materiálu adsorbují [31].

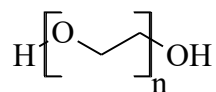
3.9 Adsorpce proteinů

Tkáňové inženýrství se v současnosti snaží nalézt a modifikovat materiály, které by byly lidským tělem dobře snášeny a byly by bioinertní [31] anebo by přímo specificky interagovaly s tkání [32]. Z tohoto pohledu může být nespecifická adsorpce proteinů nežádoucí jev. Adsorpce nastává téměř vždy, kdy dochází k fyzickému kontaktu biologické tekutiny s pevným povrchem. Adsorbovaná vrstva bílkovin může velmi negativně ovlivňovat funkci i snášenlivost vloženého implantátu. Tato adsorpce je ovlivněna především povrchem použitého syntetického materiálu, jehož úprava je klíčová nejen pro adsorpci proteinů, ale i pro případnou interakci s živými buňkami a v konečném důsledku i pro reakci organismu na cizorodý materiál. Mezi nejdůležitější faktory, které ovlivňují adsorpci proteinů na povrch pevné fáze, patří hydrofilní a hydrofobní charakter povrchu fáze, jeho elektrický náboj a topografie. Úpravou těchto parametrů lze výrazně snížit nespecifickou adsorpci přítomných proteinů na povrch syntetického materiálu a vyvinout tak materiály vhodné k aplikaci v oblasti tkáňového inženýrství [31].

Whitesides a spolupracovníci určili, že k adsorpci proteinů rezistentní funkční skupiny jsou polární, elektricky neutrální látky, které jsou vhodnými akceptory vodíkového můstku, ale nejsou jeho donory. Tyto skupiny je možné na povrch materiálu zavést syntetickou cestou [33].

V oblasti tkáňového inženýrství jsou široce využívány materiály s povrchem modifikovaným polyethylenoxidem **16**, tzv. PEO-modifikované povrchy. V biochemii se široce uplatňuje název polyethylenglykol, který však označuje pouze nízemolekulární polyethylenoxid [26] a značí se PEG. Některé zdroje rozdělují PEG a PEO podle způsobu polymerizace [31]. Husté uspořádání řetězců polyethylenglykolu na povrchu pevné fáze výrazně snižuje adsorpci proteinů na povrch materiálu. Hlavní důvody

odolávání modifikovaných povrchů adsorpci proteinů jsou sterické nároky řetězců, hydratace anebo tvorba vodní vrstvy [31].



16

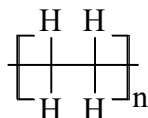
Schéma 8: Strukturní vzorec polyethylenglykolu 16

PEO nachází široké uplatnění v cíleném transportu léčiv, kde se využívají jeho blokové kopolymery jako je poly(ethylenoxid)-*block*-poly(propylenoxid), častěji známý jako Pluronic[®] [34]. Cílený transport léčiv hraje důležitou roli ve vývoji nových cytostatik, kdy cílené působení v postižené tkáni snižuje riziko závažné systémové intoxikace [35].

Problematika adsorpce proteinů na povrch syntetických materiálů je obsáhlé téma, jehož šíře přesahuje rozsah této bakalářské práce. Následující odstavce se proto soustředí pouze na materiály využívané v oční protetice a na jejich interakce s proteiny.

Polyethylen a jeho interakce s proteiny

Polyethylen **17** je termoplastický polymer, který nachází široké uplatnění v medicíně především díky své dostupnosti a biokompatibilitě. Ve formě porézního polyethylenu Medpor[®] se uplatňuje především ve výrobě orbitálních implantátů a jiných obličejových náhrad. Mnohem častěji je však využíván tzv. UHMWPE – ultra vysoce molekulární polyethylen (z *angl.* **Ultra-high-molecular-weight polyethylene**). Molekulová hmotnost tohoto polymeru je definovaná mezi $3,5 \cdot 10^6$ až $7,5 \cdot 10^6$ Da [36]. UHMWPE se využívá především jako materiál totálních i částečných kloubních náhrad.



17

Schéma 9: Strukturní vzorec polyethylenu (PE) 17

Klouby patří k nejvíce namáhaným částem lidského těla. Z tohoto důvodu je zapotřebí, aby materiály, využívané k výrobě kloubních náhrad, byly dostatečně pevné a odolné. Tyto materiály musí čelit značnému posuvnému tření, které při pohybu náhrady vzniká mezi polymerní fází náhrady a jejím keramickým nebo kovovým protipólem.

Při posuvném tření se z polymerní fáze náhrady mohou uvolňovat částice polyethylenu o velikosti 0,1 – 10 μm , které se efektivně uplatňují při aktivaci makrofágů. Aktivace makrofágů může vést ke tvorbě aseptického zánětu. Jedná se o zánět způsobený fyzikální nebo chemickou příčinou, kdy organismus produkuje protilátky jen proti poškozeným buňkám tkáně, nikoliv proti příčině zánětu. Takový stav může vést až k uvolnění implantátu [37].

Další výzkumy chování částic UHMWPE o velikosti 0,1-10 μm prokázaly adsorpci proteinů na jejich povrch, která ve fyziologických podmínkách proběhla ireverzibilně. Studována byla adsorpce lidských plazmatických proteinů: sérového albuminu (HSA), imunoglobulinu G (HIgG), globulinů ($\text{H}_{\alpha_1}\text{AG}$ a $\text{H}_{\alpha_1}\text{AT}$) a holotransferinu (HHT). Všechny zmíněné proteiny vykazovaly podobný způsob hydrofobní vazby k částicím UHMWPE [38]. Lze předpokládat, že samotné částice UHMWPE o „kritické“ velikosti 0,1 – 10 μm nezpůsobují granulomatózní záněty přímo ze své podstaty, ale že na ději participuje i denaturace proteinů na jejich povrchu. Imunitní systém může tyto denaturované proteiny vyhodnotit jako cizorodé látky a spustit imunitní reakci proti nim, nikoliv proti samotným uvolněným částicím z kloubní náhrady.

Akryláty a jejich interakce s proteiny

Kopolymery esterů kyseliny methakrylové **18** (Schéma 10, str. 31) jsou mimořádně dobře snášeny živou tkání, což z nich činí nenahraditelné protetické materiály. Z těchto esterů si největší pozornost zasluhují ty, které obsahují v postranním řetězci alespoň jednu hydroxylovou funkční skupinu. Takové estery se označují jako hydrogely a nacházejí aplikaci ve výrobě kontaktních čoček, které se původně vyráběly ze skla [22].

Průlomem v této oblasti byl návrh aplikace hydrogelů pro výrobu kontaktních čoček Ottou Wichterlem roku 1959 [26]. Hydrogely jsou vytvořeny buď na bázi přírodní látky (agarosa, alginát, kolagen), nebo jako syntetické materiály

(polyethylenoxid a jeho kopolymery, polyakryláty nebo polypeptidy). Obě skupiny se využívají v oblasti tkáňového inženýrství a jsou optimalizovány jejich možnosti hlavně z hlediska výživy umělé tkáně [34].

Také použití syntetických materiálů na bázi kopolymerů kyseliny methakrylové **18** a kyseliny akrylové **19** (Schéma 10) je dnes širší než v polovině 20. století. Výjimečnou biokompatibilitu vykazuje zejména poly(2-methoxyethylakrylát), PMEA, **20**. Tento polymer vykazuje biokompatibilitu v krevním řečišti zejména z hlediska adheze krevních destiček, adheze nebo aktivace leukocytů a koagulace [39].

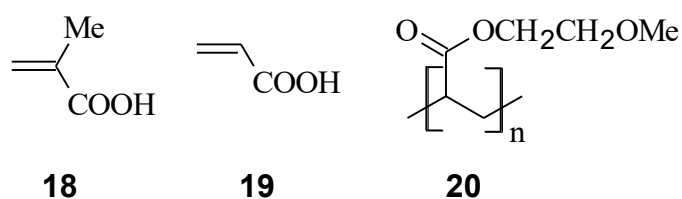


Schéma 10: Strukturní vzorce medicínsky aplikovatelných monomerů a polymeru z řady akrylátů. Vytvořeno podle [39].

Adheze krevních destiček (trombocytů) a jejich agregace je přirozená odpověď organismu na krvácivé poranění. Při tomto procesu v krevním řečišti vznikají tromby – intravitálně vzniklé krevní sraženiny. Tvorbu trombu katalyzuje thrombin (koagulační faktor IIa) a dochází při ní k přeměně rozpustného fibrinogenu na nerozpustný fibrin. Z tohoto důvodu jsou tromby pevné. Neregulovaná tvorba trombů (neregulovaná hemokoagulace) může vést k závažnému poškození kardiovaskulárního traktu [35].

Kromě přímého krvácivého poranění může syntézu trombů aktivovat i přítomnost zánětu nebo cizorodé látky. Bylo dokázáno, že adheze krevních destiček (první krok tvorby trombu) je úzce spjata s konformací proteinů adsorbovaných na povrch syntetického materiálu. Pokud si protein i po adsorpci na syntetický povrch zachovává nativní konformaci nebo ji jen minimálně pozmění, pak na povrchu materiálu nedochází k adhezi destiček vůbec nebo je velmi snížena. Naopak, v případě kdy protein na povrchu umělé tkáně denaturuje, je adheze krevních destiček a syntéza trombů zvýšena [39].

Poly(2-methoxyethylakrylát) ve srovnání s jinými poly(meth)akryláty výrazně potlačuje adhezi trombocytů. Z tohoto důvodu může být využíván k povrchové úpravě umělých orgánů [39].

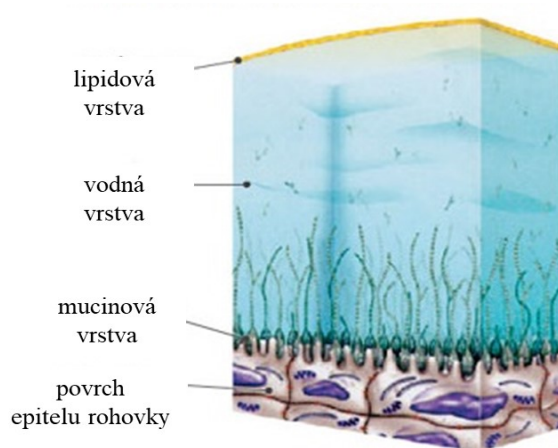
Z výše uvedeného vyplývá, že právě plazmatické proteiny hrají největší roli v akceptování implantátu *in vivo*. Z tohoto důvodu se provádějí další výzkumy vedoucí k syntéze nových materiálů, nebo k povrchové úpravě těch stávajících, tak aby na použitých materiálech již nedocházelo k denaturaci plazmatických proteinů a byly plně kompatibilní s krví.

3.10 Proteiny lidských slz

Lidské slzy jsou vylučovány slzní žlázou a přídatnými slzními žlázkami. Jedná se o žlázy s vnější sekrecí. Odvod slz je zajišťován slzními body, kde se přebytečné slzy sbíhají a odvádějí do nosu [40]. Obecně se rozlišují tři typy slz – bazální (udržují přirozenou vlhkost oka), reflexní (slouží převážně k vyplavení dráždivých nečistot z oka) a psychické (pláč způsobený emočním přepětím) [41]. Emoční slzy jsou vyplavovány díky propojení autonomního nervového a limbického systému [42].

Slzy se na první pohled jeví jako jednoduchá, čirá tekutina. Ve skutečnosti se však jedná o rozmanitý koloidní systém tvořený více než 1500 bílkovinnými druhy a řadou dalších komponent. Z fyziologického hlediska jsou slzy podobné lymfě nebo krevnímu séru [43]. Lipidová složka je vylučována Meibomovými žlázami.

Slzní film má tloušťku 30-40 μm [43]. Základní struktura slzního filmu je uvedena na Obrázku 6.

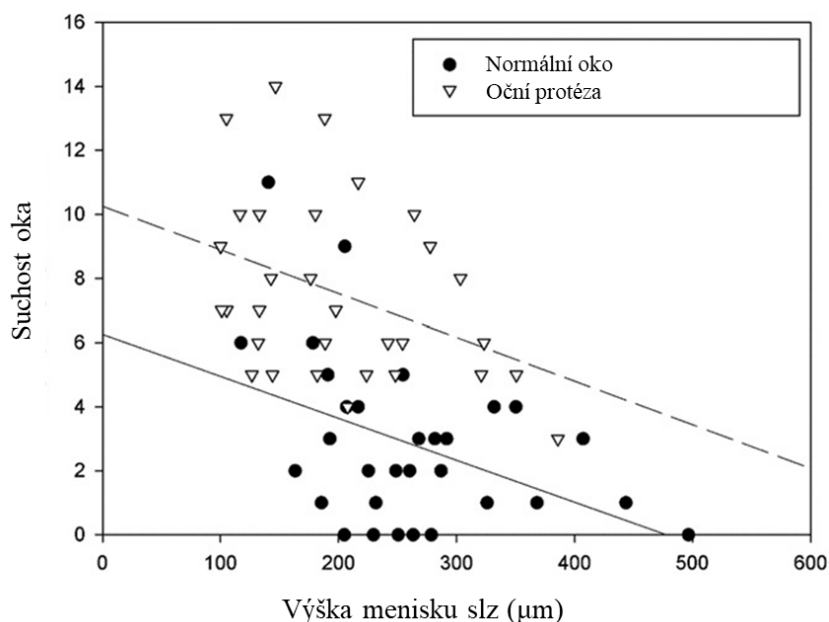


Obrázek 6: Slzní film. Upraveno podle [44].

Vodná vrstva tvoří až 90 % celkové tloušťky slzního filmu. Obsahuje okolo 0,9 – 1 hm. % anorganických solí (chloridy sodný a draselný [45]) a řadu proteinů jako

jsou lysozym, laktoferin a lipocalin [43]. Dalšími významnými složkami slz jsou močovina, vitamin C a glukosa [45].

Slzní film na povrchu oka zajišťuje dostatečnou hydrataci rohovky a má zásadní vliv na vidění a strukturu povrchu oční koule [43]. Napomáhá ke správné refrakci světla na povrchu oka a udržuje oční okolí stabilní i za proměnlivých podmínek. Navíc rohovku chrání před vysycháním a nečistotami z okolí [42]. Dysfunkce v jeho struktuře může vést k rozvinutí syndromu suchého oka [46]. Toto onemocnění může vést až k poškození povrchu oka. Dříve se uváděla jako jeho stěžejní příčina nedostatečná tvorba slz nebo jejich nadměrné vypařování, dnes je však nemoc považována za multifaktoriální [47]. Onemocnění výrazně narušuje pacientův každodenní život z důvodu neustálého pocitu nepohodlí. Rizikové faktory rozvoje onemocnění jsou například starší věk, ženské pohlaví nebo dietní režim s nedostatečným příjmem omega-3 mastných kyselin nebo vitaminu A [47]. Při nemoci klesá množství tvorby slz změřitelné Schirmerovým testem. Ke srovnatelnému poklesu dochází i při srovnání zdravé očnice a očnice se vsazenou protézou [48]. Situaci vhodně dokumentuje Obr. 7. Skóre suchosti oka bylo vypočítáno na základě celkového součtu bodů v dotazníku určeném pro pacienty. Pacienti byli tázáni na pocity suchého oka při různých podmínkách, které mohli kvantifikovat na jednotkové stupnici od 0 (nikdy) do 4 (vždy).



Obr. 7: Srovnání skóre suchého oka u normálního a umělého oka. Upraveno podle [48].

Lysozym

Lysozym byl objeven roku 1922 Alexanderem Flemingem. Jedná se o téměř všudypřítomný antibakteriální enzym ze třídy hydrolas (EC 3.2.1.17) [49]. V lidském těle se lysozym vyskytuje například ve slinách, slzách (1-2 mg/ml [50]), mateřském mléce, sputu a žaludečním sekretu [51].

Hlavní úlohou imunologického působení lysozymu je hydrolýza β -1,4 vazeb mezi kyselinou N –acetylmuramovou **21** a N-acetylglukosaminem **22**. Tyto vazby jsou přítomny v peptidoglykanu **23** – složce buněčných membrán řady bakterií. Schopnost štěpení vazeb peptidoglykanu je příčinou antibakteriálních účinků lysozymu. Místo štěpení ve struktuře peptidoglykanu je uvedena na Schématu 11. V slzách štěpí lysozym buněčné stěny řady grampozitivních bakterií, přítomných ve vzduchu [51]. Narušením buněčné stěny dochází k rozpadu buňky a vnitřní struktury následně podléhají osmotické lýze [53].

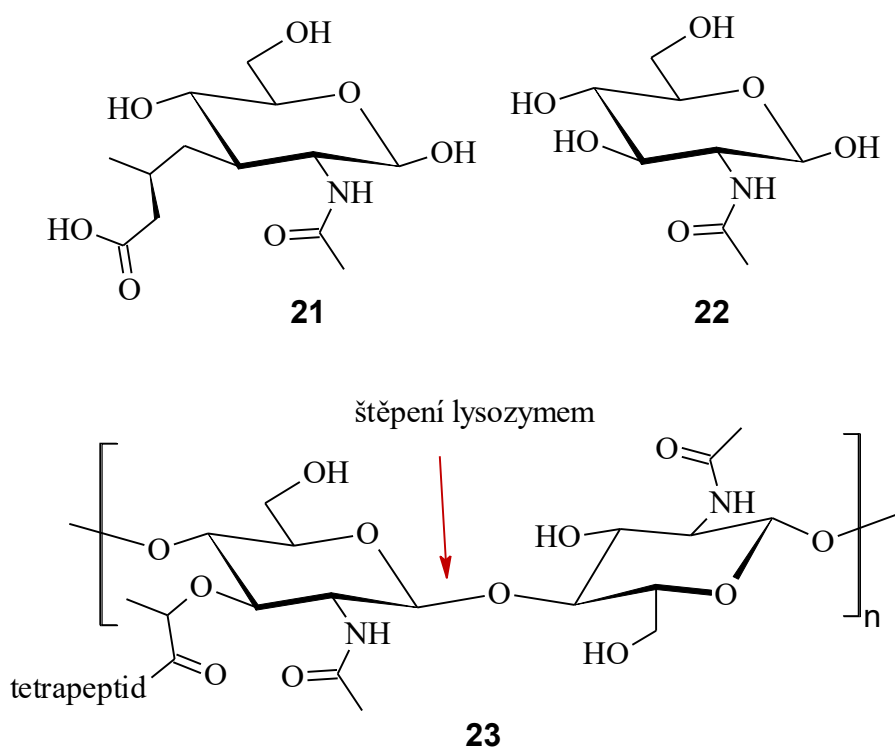


Schéma 11: Struktura peptidoglykanu a jeho složek. Vytvořeno podle [51] a [54].

Strukturně se lysozym skládá pouze z jednoho polypeptidového řetězce sestávajícího ze 129 aminokyselinových zbytků. V molekule se nachází centrální

šterbina se šesti vazebnými podmišty. Na tato mřta se mohou navazovat vhodné substráty a inhibitory. Mřsta D a E (viz. Schéma 12) jsou zodpovědná za štěpení vazeb substrátu. V prvním kroku zřejmě glutamová kyselina (Glu 35) protonizuje acetalovou vazbu, zatímco aspartát (Asp 52) stabilizuje vznikající karbokation [51]. Mechanismus neenzymatického štěpení acetalu je pro úplnost znázorněn na Schématu 13.

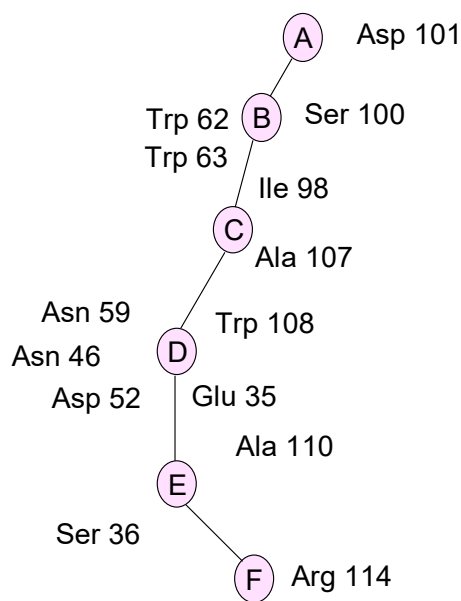


Schéma 12: Znázornění katalytického místa lysozymu. A – F představují glykosylové jednotky hexasacharidu. Upraveno podle [51].

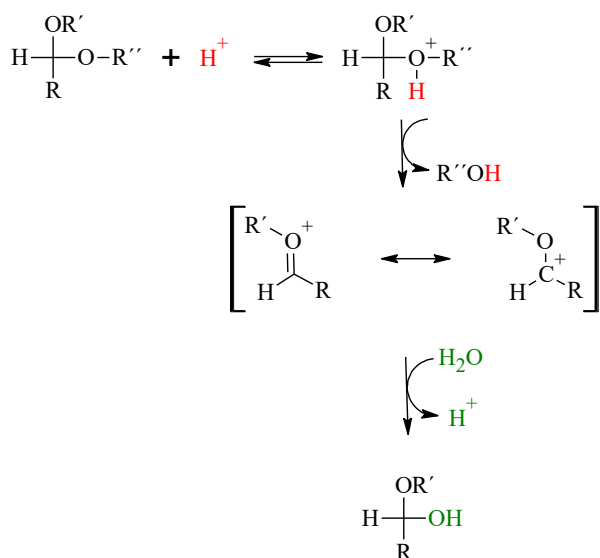


Schéma 13: Neenzymatická tvorba hemiacetálu. Vytvořeno podle [52].

Jelikož je molekula lysozymu malá, dochází k jeho vyloučení z fagocytujících buněk do všech tělních tekutin včetně krve, moči a slin. Ve slinách má lysozym významné antibakteriální účinky například u koček, které si díky jeho přítomnosti olizováním rány dezinfikují. Podobné instinktivní chování je postřehnutelné i u člověka. Ten v dřívějších dobách používal k čistění ran i moč [53]. Lysozym byl tak využíván jako přírodní antibiotikum dávno před svým objevením.

Kromě lysozymu se v slzách vyskytují ještě laktoferrin a lakritin. Laktoferrin má baktericidní i fungicidní působení a v slzách slouží jako přirozená imunitní odpověď. Díky schopnosti vázat železo zabraňuje laktoferrin růstu bakterií, který je na přítomnosti železa závislý. Může se také vázat na buněčné stěny bakterií a ovlivňovat tak permeabilitu membrán [55].

Lakritin je obsažen v lidských slzách i slinách. V oku hraje důležitou roli při léčení ran na rohovce. Baktericidní účinek má fragment na C-konci lakritinu, který se může z proteinu odštěpit [56].

3.11 Hygiena oční protézy a očního důlku

Zdravotní stav vidoucího oka je pro pacienta s oční protézou z pochopitelných důvodů na prvním místě. O vidoucí oko si může dělat až úzkostné obavy a podřizovat mu svůj každodenní život [57]. Nicméně pacientovu pozornost zasluhuje i druhý oční důlek, jehož stav by mohl indikovat zdravotní problém přenosný i na druhé oko.

Až 93 % pacientů se po evisceraci nebo enukleaci potýká se zvýšenou tvorbou sekretu v oblasti očního důlku. Tento sekret jim způsobuje nepohodlí, ulpívá na protéze a dráždí tak své okolí [58].

Mezi příčiny tvorby sekretu patří záněty a jiné alergické reakce, suchost oka, ulpívání depozitů na povrchu oční protézy, nevyhovující hygiena nebo nedostatečná tvorba slz [58].

Nedostatečná tvorba slz v postiženém oku způsobuje pocity suchého oka nebo nepohodlí v očním důlku. Při porovnání výše menisku slzního filmu na zdravém oku a na oční protéze je patrný značný pokles slzotvorby v postiženém důlku [48]. Tento pokles může být způsoben dysfunkcí Meibomových žláz [58], které vylučují lipidovou složku slzního filmu. Akrylátové oční protézy mají navíc hůře smáčivý povrch a již

vytvořený slzní film se nemůže tak dobře rozprostřít po celé ploše protézy jako je tomu u skleněných protéz [13].

Aby se mírnily pocity nepohodlí a tvorba sekretu, doporučuje se o oční protézu a celé její okolí pravidelně pečovat. Jelikož není možné nalézt univerzální režim pro všechny pacienty s oční protézou, musí si pacienti sami vyzkoušet několik odborných doporučení, nebo si vyměňovat tipy mezi sebou navzájem. V České republice k tomuto účelu slouží web www.zivotbezoka.cz [59].

Odborná literatura se shoduje, že oční protéza by měla být vyjmuta pokaždé, když je očnice drážděna [60][61]. Při vyjmutí oční protézy je ale zapotřebí dodržovat přísnou hygienu. Na protézu je třeba sahat pouze čistýma rukama, nepokládat ji na nevhodná místa ani ji neutírat obyčejnými ručníky nebo kapesníky. Takové zacházení zvyšuje riziko zanesení nečistot nebo bakterií, které poté mohou vyvolat zánětlivé reakce v oku [61]. U pacientů, kteří si vyjímají protézu častěji, bylo nalezeno v očním okolí více gramnegativních bakterií, než u těch, kteří ji nevyjímají tak často [62].

Většina výrobců očních protéz [60] doporučuje omývat oční protézu v mírném mýdlovém roztoku, dětském šamponu nebo v čistícím roztoku na tvrdé kontaktní čočky. Nedoporučováno je používání běžného mýdla z domácnosti (může obsahovat barviva, oleje) nebo alkoholu, který může poničit povrch oční protézy [61]. Toto poškození může vést až k zánětům očních víček [63].

Oční víčka a řasy by měly být denně omývány, protože přítomnost oční protézy může vést k hyperkeratinizaci Meibomových žláz [61]. Hyperkeratinizace je proces tvorby zrohovatělých buněk, které se špatně odlučují a ucpávají tak mazové žlázy. Každodenní čištění řas a víček znatelně zmírňuje nepříjemné pocity [64].

3.12 Psychologie ztráty oka

Zrakové vnímání napomáhá člověku rozlišovat a kategorizovat podněty, což mu usnadňuje adaptaci v prostředí a možnost adekvátně reagovat na nastalou situaci. Zrakové vnímání je základem rozpoznávání, díky kterému může člověk odlišit známé od neznámého, klasifikovat situace a reagovat na ně [65].

Z psychologického hlediska je oslepnutí na jedno oko nebo jeho ztráta pro pacienta značným stresem. Adaptační doba na monokulární vidění se odhaduje do

jednoho roku [57], ale psychologické a sociologické problémy mohou pacientovi přetrvávat.

Mezi nejčastější psychologické potíže patří ztráta sebevědomí a úzkostný strach z úrazu druhého (posledního) oka. Tento faktor může pacienta odvádět od běžných činností (sport) a separovat ho tak od kolektivu [57].

Protože pacient s jediným okem ztrácí prostorové vidění, je pro něj řada činností hůře proveditelná, například podávání ruky, nalévání nápojů nebo udržení očního kontaktu. Pacient se snaží nepříjemným situacím vyhnout a může tak ztrácet důležité sociální vazby. Pacienti mají také omezený výběr zaměstnání [57]. Kromě fyzických limitů je rozhodujícím faktorem také strach z pracovního úrazu na druhém oku.

V některých případech mohou psychologické potíže provázet i fyzické problémy jako je bolest krku z fixace pouze jedním okem, namáhání oka nebo únava [57].

3.13 Žák se zrakovým postižením

Před rokem 1989 byli žáci se zrakovým postižením zařazováni do speciálních školských zařízení. V dnešní době, po reformě školského zákona v roce 1989, zajišťuje žákům se zrakovým postižením vzdělávání zákon č. 561/2004 Sb., o předškolním, základním, středním, vyšším odborném a jiném vzdělání (školský zákon), ve znění pozdějších přepisů, vyhláška č. 72/2005 Sb., o poskytování poradenských služeb ve školách a školských poradenských zařízeních, ve znění vyhlášky č. 116/2011 Sb., a vyhláška č. 73/2005 Sb., o vzdělávání dětí, žáků a studentů se speciálními vzdělávacími potřebami a dětí, žáků a studentů mimořádně nadaných, ve znění vyhlášky č. 147/2011, [66].

Trendem současného školství je zapojení zrakově postižených studentů do normálních škol. Zapojení se do kolektivu žákovi napomáhá překonat případné psychické potíže a tvořit sociální vazby. Výuku je potřeba žákovi přizpůsobit s ohledem na jeho postižení. Nejčastější formou modifikace je zajištění místa v předních lavicích, pořízení sklopné desky lavice, kterou si může student korigovat vzdálenost textu od obličeje, dobré osvětlení a vhodná grafická úprava textů [66].

Podle mého názoru by měl být učitel o žakově stavu aspoň rámcově informován, a měl by na jeho situaci brát zřetel nejen ve školní výuce, ale zejména na školních exkurzích a výletech.

3.14 Metody spektrofotometrického stanovení proteinů

Z praktického hlediska nachází spektrometrické stanovování množství bílkovin ve vzorku uplatnění spíše v analýze potravin, při určování nutriční hodnoty potravin nebo v klinické praxi. Stejně dobře lze však spektrometrie aplikovat na nalezení bílkovin zachycených na syntetickém materiálu jako je polymethylmethakrylát.

Nejznámějšími metodou spektrometrických stanovování obsahu bílkovin je spektrofotometrie ve viditelné a ultrafialové oblasti spektra. Tato metoda vyniká svou dostupností a relativní instrumentální jednoduchostí. Přesto poskytuje velmi dobré výsledky ohledně obsahu a množství bílkovin ve vzorku a je schopna i bližšího přiblížení změny struktur bílkovin, např. při jejich denaturaci. Výsledky a stanovení jsou závislé na zvolené vlnové délce, λ [54].

Při zjišťování obsahu bílkovin v roztoku se nejčastěji volí vlnová délka, λ , 280 nm. Při této vlnové délce totiž absorbují především postranní řetězce aromatických aminokyselin, jako jsou fenylalanin (Phe) **24**, tyrosin (Tyr) **25** a tryptofan (Trp) **26**. Tyto aminokyseliny jsou v bílkovinách a peptidech hojně zastoupeny. I když je stanovení přesné, stále ve větším množství koreluje s primární strukturou bílkovin. Nukleové kyseliny (jsou-li ve vzorku přítomny) při této vlnové délce absorbují jen málo. Jejich maximum leží v oblasti vlnové délky 260 nm [54].

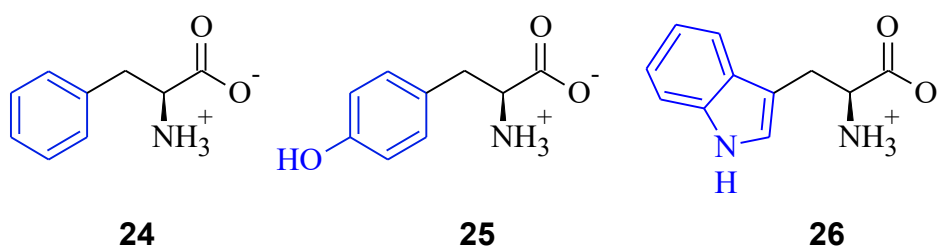


Schéma 14: Aromatické aminokyseliny se zvýrazněnou chromoforovou složkou.

Aromatické struktury aminokyselin zachycené na Schématu 14 nejsou jedinými chromofory ve struktuře proteinu. Při vlnových délkách mezi 200 – 220 nm absorbují i samotná peptidová vazba. Stanovení množství bílkovin na základě absorpce peptidových vazeb je mnohem přesnější metoda, která je však instrumentálně náročnější. Navíc ji mohou rušit složky běžných pufrů [54].

Velmi oblíbená metoda stanovení bílkovin je tzv. nepřímé stanovení. Nepřímé stanovení proteinu má základ v jeho reakci s činidlem za tvorby barevného produktu. Tyto metody vynikají svou instrumentální jednoduchostí a citlivostí.

Biuretová metoda se zakládá na reakci proteinu s Cu^{2+} ionty, stabilizovanými ve vínanovém komplexu. Vzniká fialově zbarvený produkt. Tato metoda je rychlá, proveditelná i ve výuce a instrumentálně jednoduchá. Mezi nepřímými stanoveními proteinů patří biuretová metoda k těm méně citlivým. Rozsah stanovení se uvádí mezi 2,5 – 20 g/l [67].

Stanovení proteinů podle Lowryho je asi nejznámější metoda pro spektrofotometrickou kvantifikaci proteinů vůbec. Základem barevné změny je redukce fosfomolybdenanových a fosfowolframových iontů přítomnými Cu^+ ionty (tyto ionty pocházejí z $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$) a aromatickými zbytky aminokyselin obsaženými v proteinu. Lowryho stanovení je časově náročnější, než biuretová metoda, navíc je jeho provedení technicky složitější. V den stanovení se musí připravit čerstvý diluent a to tak, že se smísí 1% $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ a 1% roztok vínanu sodno-draselného v poměru 1:1. následně se přidá 98 objemových dílů roztoku 2% Na_2CO_3 v 0,1M NaOH. Barevný roztok C je komerčně dostupný. Při vlnové délce 750 nm se rozsah stanovení pohybuje mezi 0,025 – 0,2 g/l. Stanovení ruší přítomnost redukujících látek, fenolů nebo některých pufrů [67][68].

Obdobou Lowryho stanovení je stanovení bicinchonovou kyselinou **27** (BCA). Základem stanovení je přeměna Cu^{2+} iontů na Cu^+ , které následně reagují s bicinchonovou kyselinou v zásaditém prostředí. Reagens se získává smísením 4% CuSO_4 a roztoku BCA (1% BCA, 0,16% vínan sodný, 2% Na_2CO_3 , 0,95% NaHCO_3 v 0,1M NaOH) v poměru 1:50. Tato metoda poskytuje oproti Lowryho stanovení řadu výhod – není tak citlivá na přítomnost redukujících cukrů, lze provádět v alkalickém prostředí a neruší ji přítomnost močoviny. Bylo popsáno jak standardní stanovení v rozmezí 0,1 – 1 g/l, tak stanovení v mikroměřítku v rozmezí $5 \cdot 10^{-4}$ – 0,01 g/l [69]. Nevýhodou stanovení je jeho závislost na počtu aromatických zbytků v molekule proteinu a nelze tak (stejně jako u Lowryho stanovení) určit absolutní koncentrace libovolného proteinu [67][70].

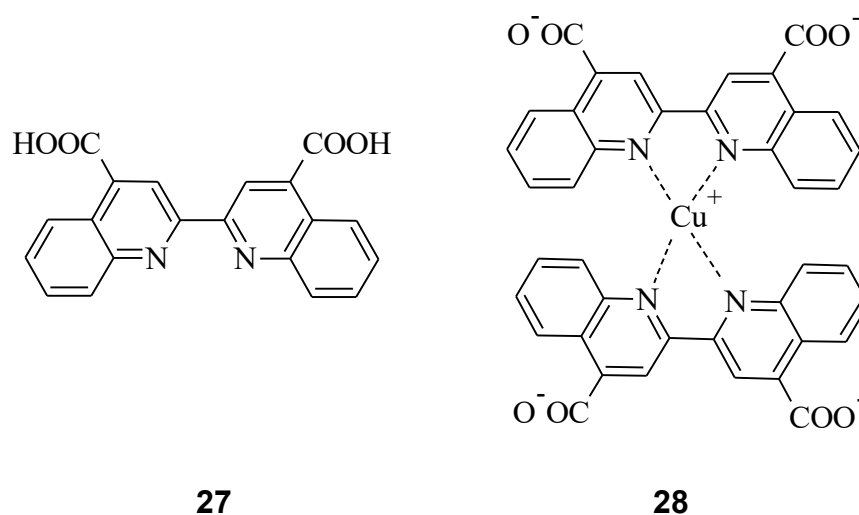


Schéma 15: Struktura BCA a její koordinace s Cu^+ iontem. Vytvořeno podle [70].

Mezi nejcitlivější a běžně prováděná stanovení patří metoda kvantifikace proteinů, jak ji uvádí Bradford [54]. Od výše zmíněných stanovení se liší již v prvním kroku, protože dochází k reakci proteinu přímo s barevným činidlem (Coomassie Brilliant Blue G250) [67]. Reagens se připravuje v den použití, tak že se rozpustí 100 mg Coomassie Brilliant Blue G250 v 50 ml EtOH, doplní se na objem 500 ml deionizovanou vodou a koncentrace se upraví EtOH, aby roztok při vlnové délce 550 nm vykazoval absorbanci 1,18. Rozsah stanovení proteinů se pohybuje mezi 0,01 – 0,1 g/l [67][70].

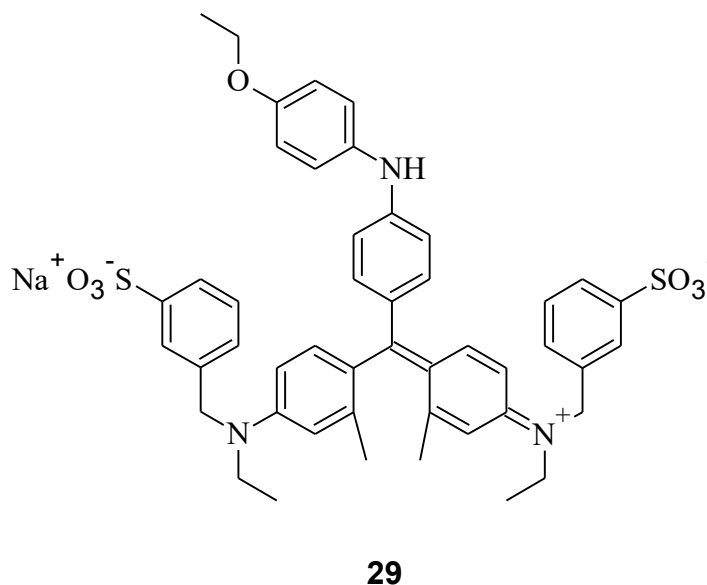


Schéma 16: Struktura Coomassie Brilliant Blue G250. Vytvořeno podle [70].

Nejpřesnější stanovení proteinů ($5 \cdot 10^{-4}$ – 0,01 g/l) poskytuje stanovení fluoreskujícího produktu po reakci proteinu s fluorescaminem. Reagens vzniká smísením borátového pufru o pH = 8,5 s roztokem fluorescaminu v acetonu (7,5 mg fluorescaminu v 25 ml acetonu p.a. čistoty). Smísení musí probíhat za stálého míchání na vortexu. Fluorescence se měří po 2 minutách při 465 nm. Excitační vlnová délka je 390 nm [67].

4. MATERIÁLY A METODY

4.1 Materiál

Destička o rozměrech 2,0 cm x 2,1 cm x 0,5 cm (šířka x délka x výška) byla zakoupena u firmy Ronald Szarvas – Výroba očních protéz. Tato destička byla originálně zhotovena z pryskyřice Superpont[®] a z jedné strany povrchově upravena pryskyřicí Meliodent[®] Heat Cure.

Kyselina citrónová, chlorid sodný a kyselina chlorovodíková byly zakoupeny u firmy Lach-Ner, s. r. o., vše v p. a. čistotě.

Lysozym byl vypreparován z vaječného bílku elektroforeticky čistý na katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy. Roztok barviva Coomassie Brilliant Blue G 250 byl rovněž připravena na katedře biochemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy.

Absorpční spektra byla měřena na přístrojích NanoVue Plus, Spektromom 195 D a Specord 250 Plus.

Adsorpce i desorpce lysozymu probíhala v sáčcích z nízkohustotního polyethylenu (recyklační symbol 4) o šířce cca 4,1 cm a výšce cca 7,1 cm.

4.2 Metody

Základní pufr **I** sloužící k omývání a přechovávání vzorků byl připraven následovně: v destilované vodě bylo rozpuštěno 4,26 g NaCl a 4,18 mg kyseliny citrónové. Roztok byl doplněn na 500 ml a jeho pH bylo upraveno na hodnotu 7,2.

V 10 ml připraveného pufru **I** bylo rozpuštěno 10 mg lysozymu extrahovaného z vaječného bílku. Získaný roztok **II** představoval v experimentu lidské slzy o koncentraci lysozymu 1 mg/ml.

Destička z polymethylmethakrylátu o celkové ploše 11,45 cm² byla několikrát pečlivě omyta destilovanou vodou a připraveným pufrem **I**, aby se zbavila interferujících nečistot a případných depozitů proteinů. Následně byla vložena do sáčku z nízkohustotního polyethylenu (recyklační stupeň 4). Do sáčku bylo k destičce přidáno 1,5 ml roztoku lysozymu o koncentraci 1 mg/ml. Sáček byl zajištěn plastovým kolíčkem

tak, aby vložená destička byla obklopena roztokem **II** ze všech stran. Toto nastavení bylo potřeba v pravidelných intervalech kontrolovat a obnovovat, kvůli nízké smáčivosti povrchu destičky. V roztoku lysozymu byla destička ponechána 48 hodin.

Destička byla opatrně vyjmuta a přeložena do nového sáčku ze stejného materiálu. Tentokrát bylo k destičce přidáno 1,4 ml 1M HCl. Obklopení destičky roztokem bylo zajištěno stejně jako v přechozím případě. Smývání depozitů z povrchu destičky trvalo 24 hodin. Během tohoto časového intervalu bylo smývání několikrát podpořeno promnutím mezi prsty.

Na konci byl roh sáčku opatrně nastříhnut a roztok byl najímán do připravené nádoby. Destička byla opatrně vyjmuta a depozity z jejího povrchu byly omyty 100 μ l 1M HCl z pipety a kapky byly z povrchu destičky následně sklepany do jímací nádoby.

Najímaný roztok byl proměřen na přístrojích NanoVue Plus, Spektromom 195 D a Specord 250 Plus.

4.3 Dotazníkové šetření

Dotazníkové šetření se široce využívá při výzkumu veřejného mínění a jeho výsledky mohou sloužit jako kvantitativní ukazatel zkoumaného jevu. Zkoumanými jevy bývá nejčastěji chování jedince, víra, názory a postoje nebo znalosti [71]. V pedagogice se nejvíce poměřují právě znalosti vzorku.

Vzorek při dotazníkovém šetření musí být dostatečně reprezentativní, aby se získané závěry daly vztáhnout na celou základní populaci. Základní populace je soubor jednotek, který v dané situaci zastupuje populaci cílovou [72].

Jako vzorek jsem zvolila studenty Gymnázia Jana Nerudy, školy hlavního města Prahy. V rámci gymnázia jsem vytvořila dva homogenní vzorky.

Prvním vzorkem byli studenti Gymnázia Jana Nerudy, školy hlavního města Prahy, kteří společně navštěvovali seminář z fyzikální chemie (13 studentů). Druhým vzorkem bylo 17 studentů téhož gymnázia, kteří společně navštěvovali seminář z literatury. Celkem tedy byly zkoumány názory 30 studentů. Oba vzorky jsou víceméně homogenní, co se týče věku, zaměření současného i plánovaného studia a školního prostředí. Vůči sobě jsou homogenní v otázce věku a prostředí ve škole.

Cílem dotazníkového šetření bylo zhodnotit znalosti studentů gymnázia v oblasti oční protetiky a posoudit jejich postoje ohledně spolužákova i vlastního hypotetického postižení na oku. Výsledky obou vzorků byly následně porovnány.

Výsledky byly získány vyplněním dotazníku studenty. Vyplnění dotazníků probíhalo na začátku vyučovací hodiny chemického a literárního semináře v průběhu dubna 2018. Byl zvolen nestandardizovaný dotazník s uzavřenými odpověďmi výběrového stylu s celkovým počtem 15 otázek. Otázky uvedené v dotazníku byly vytvořeny na základě konzultace s pacienty s oční protézou, lékaři, na základě orientačního předvýzkumu u vysokoškolské veřejnosti a na základě informací získaných četbou referencí [73] - [75]. Veškerá získaná data jsou zcela anonymní.

5. PRAKTICKÁ ČÁST

5.1 Výsledky stanovení adsorpce lysozymu

Kalibrační závislosti přímého stanovení obsahu lysozymu

Na přístroji NanoVue Plus byly naměřeny následující kalibrační křivky pro vlnové délky 210 nm, 220 nm a 280 nm s optickou dráhou 0,5 mm v programu Multiple Wavelength. Kalibrační křivky se vztahují k ředící řadě roztoku lysozymu podle Tabulky 1. Jako ředící roztok sloužila 1M HCl. Kalibrační křivky zobrazují absorbance po korekci pozadí a prezentované hodnoty by měly korelovat pouze s přítomností lysozymu v roztoku.

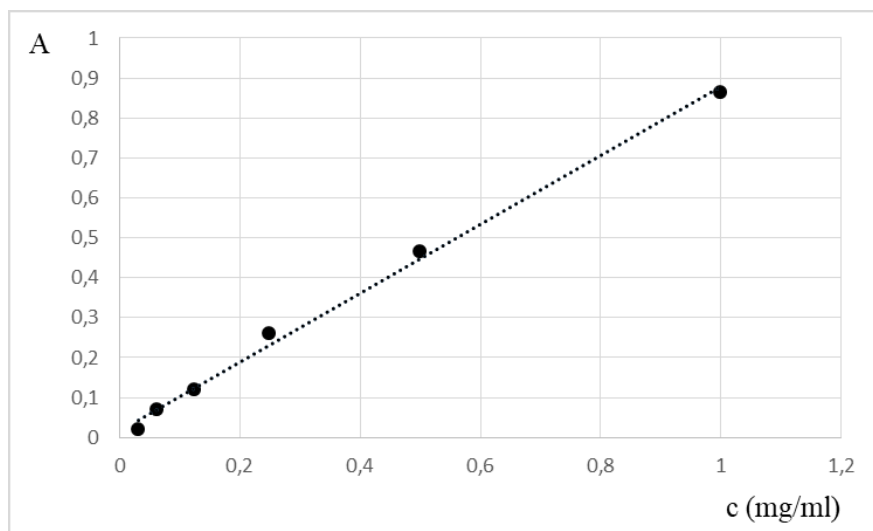
Tabulka 1: Koncentrace lysozymu

Roztok	1	2	3	4	5	6
c_{LYZ} (mg/ml)	1,0	0,5	0,25	0,125	0,0625	0,0313
V (ml)	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0

Roztoky ke kalibraci byly připraveny ředící řadou těsně před jejich proměřením na přístroji NanoVue Plus, aby nedocházelo ke zbytečným ztrátám proteinu například jeho adsorpcí na stěny nádobek. Z celkového zásobního množství vzorku (2 ml) byly k jednotlivým měřením používány vždy 3 μl .

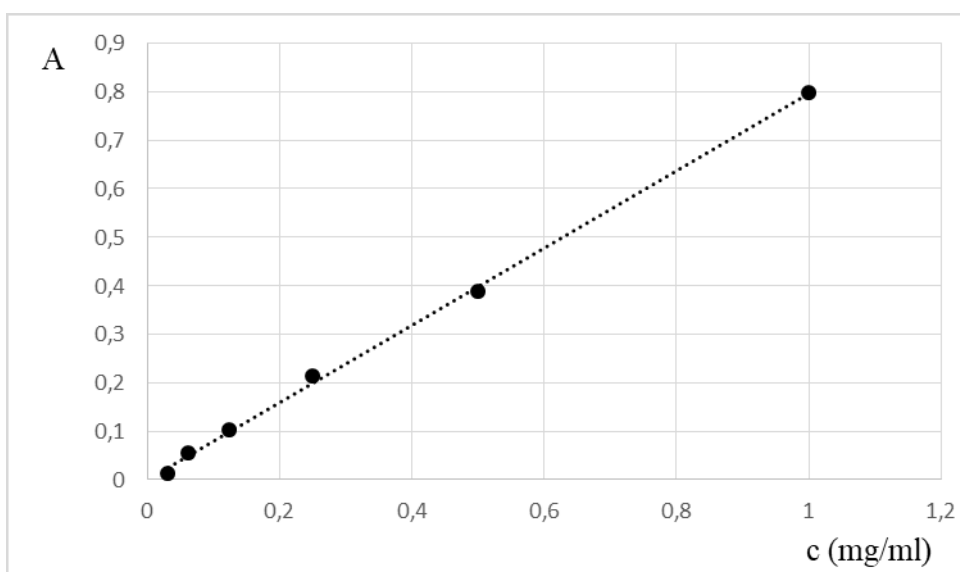
Pro větší přehlednost jsou kalibrační křivky uvedeny pospolu na str. 47 – 48.

Pro vlnovou délku 210 nm měla rovnice regrese tvar: $y = 0,8598x + 0,0175$ s koeficientem spolehlivosti $R^2 = 0,9964$. Podle návodu v [76] byl pro vlnovou délku 210 nm v programu MS Excel určen limit detekce (LOD) na 54 μg lysozymu v mililitru a limit kvantifikace (LOQ) na 229 μg lysozymu v mililitru.



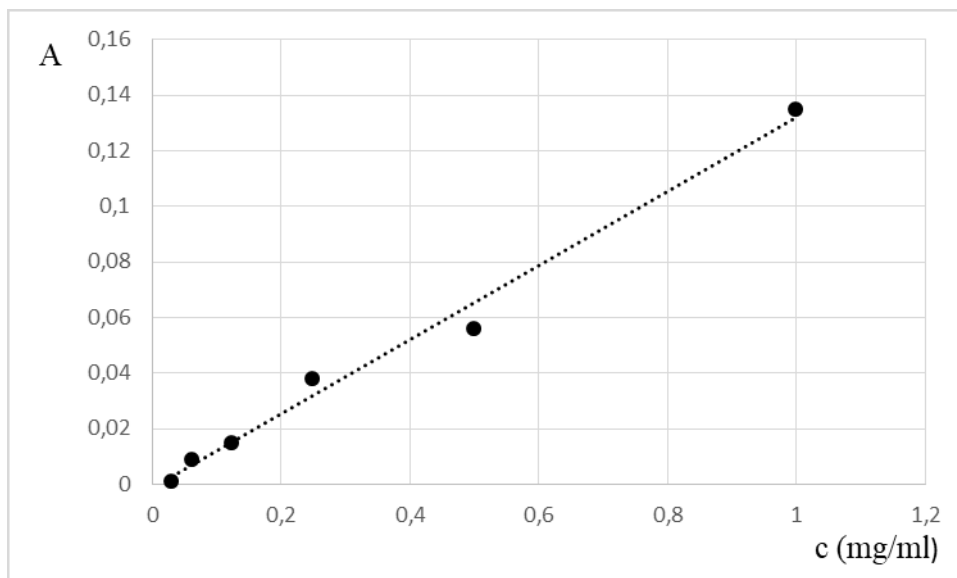
Graf 1: Kalibrační křivka lysozymu při vlnové délce 210 nm.

Pro vlnovou délku 220 nm (oblast absorpce peptidových vazeb [54]), měla regresní rovnice tvar $y = 0,7958x + 0,005$ s koeficientem spolehlivosti $R^2 = 0,999$. Podle [76] byl limit detekce (LOD) určen na 41 μg lysozymu v mililitru a limit kvantifikace (LOQ) na 134 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Kalibrační křivka je znázorněna na Grafu 2.



Graf 2: Kalibrační křivka lysozymu při vlnové délce 220 nm.

Graf 3 dokumentuje průběh kalibrační křivky pro vlnovou délku 280 nm. Rovnice regrese měla tvar $y = 0,1334x - 0,0014$ s koeficientem spolehlivosti $R^2 = 0,9887$. LOD byl určen na 143 µg/ml a LOQ na 453 µg/ml.



Graf 3: Kalibrační křivka lysozymu při vlnové délce 280 nm.

Přehled limitů detekce (LOD) a limitů kvantifikace (LOQ) pro různé vlnové délky dokumentuje Tabulka 2.

Tabulka 2: Přehled limitů detekce a kvantifikace lysozymu pro vlnové délky 210, 220 a 280 nm na přístroji NanoVue Plus s optickou dráhou 0,5 mm.

Vlnová délka	LOD	LOQ
210 nm	54 µg/ml	229 µg/ml
220 nm	41 µg/ml	134 µg/ml
280 nm	143 µg/ml	453 µg/ml

Ze získaných hodnot je zřejmé, že nejcitlivější na detekci lysozymu na přístroji NanoVue Plus s optickou dráhou 0,5 mm byla vlnová délka 220 nm.

Přímé stanovení adsorpce lysozymu

Roztok získaný smýváním lysozymu z polymethylmethakrylátové destičky byl proměřen na přístroji NanoVue Plus v programu Multiple Wavelength (210, 220 a 280 nm) s optickou dráhou 0,5 mm. Signál naměřený přístrojem se nedal odlišit od šumu, tak jak jej popisují [76] a [77]. Z výsledků kalibrační křivky pro nejcitlivější vlnovou délku 220 nm vyplývá, že obsah lysozymu v roztoku musel být menší než limit jeho detekce (41 $\mu\text{g/ml}$), což vzhledem ke styčnému povrchu destičky 11,45 cm^2 odpovídá adsorpci menší než 5,37 $\mu\text{g/cm}^2$. Tentýž roztok byl proměřen ještě na přístroji Specord 250 Plus. Měření přítomnosti proteinů nedetekovalo.

V rámci mé bakalářské práce bylo experimentálně vyzkoušeno i stanovení proteinů jak uvádí Bradford na přístroji Spektromom 195 D. Reakce s barvivem proběhla s 0% konverzí výchozí látky. Podle dohledané literatury bylo nastavení experimentu pro toto stanovení nevhodné kvůli přítomnosti 1M HCl, která ruší toto stanovení už při koncentraci 100 mM [68].

5.2 Výsledky pilotního šetření na gymnáziu

Tabulka 3a porovnává skupiny studentů zkoumané v pilotním šetření z hlediska základní charakteristiky vzorku (pohlaví, věk, plánované studium a povědomí o problematice). Sestává ze čtyř otázek, z nichž otázka č. 2 (Věk) je otevřená.

Z výsledků vyplývá, že nadpoloviční většinu na chemickém semináři tvořili muži, zatímco na literárním semináři bylo nadpoloviční množství žen. Volba studia odpovídá zaměření semináře. Žádný student se s problematikou podrobně nesetkal.

Tabulka 3a: Charakterizace vzorku pilotního šetření

	Počet studentů chemického semináře	Počet studentů literárního semináře
Počet studentů	13	17
1. Pohlaví		
muž	9	7
žena	4	10

(pokračování na str. 50)

(Tabulka 3a - pokračování ze str. 49)

	Počet studentů chemického semináře	Počet studentů literárního semináře
2. Věk		
18 let	5	3
19 let	7	11
20 let	0	2
nezodpovězeno	1	1
3. V jakém oboru zvažujete další studium?		
humanitní	2	9
přírodovědný	7	5
medicína	2	0
humanitní i přírodovědný	1	1
přírodovědný i medicína	1	0
nezodpovězeno	0	2
4. Setkal/a jste se někdy s problematikou očních protéz?		
nikdy, slyším o ní poprvé	8	12
okrajově	5	5
ano, podrobně	0	0

Tabulka 3b posuzuje odpovědi studentů na otázky výběrového typu, které prověřují jejich znalosti z oboru oční protetiky. Každá odpověď má jedinou správnou odpověď, která je v tabulce označena symbolem *.

Výsledné zastoupení správných odpovědí u otázek č. 5 – č. 9 poukazuje na mírně lepší povědomí o problematice u studentů chemického semináře. Četnost správných odpovědí je ale u obou skupin relativně nízká.

Zajímavý výsledek poskytuje otázka č. 7, u které je četnost správné odpovědi vyšší u studentů humanitního semináře (odpověď správně určilo 6 studentů ze 17 dotázaných), oproti studentům chemického semináře (odpověď správně určili 3 studenti z 13 dotázaných).

Tabulka 3b: Výsledky znalostní části dotazníku

	Počet studentů chemického semináře	Počet studentů literárního semináře
5. Jaké tvrzení podle Vás nejlépe charakterizuje pojem anaplastologi?		
Je to odvětví makromolekulární chemie zabývající se návrhem a syntézou materiálů pro tkáňové inženýrství.	6	13
Je to vědní obor zabývající se rekonstrukcí a zkrášlováním lidského těla umělými prostředky. *	3	1
Je to vědní obor zabývající se biodegradabilními materiály vyzískanými z recyklovaných plastů.	4	3
6. Jaký tvar má podle Vás oční protéza?		
kulový	1	6
elipsoidový	8	9
mušlovitý *	4	2
7. Co označuje pojem eviscerace?		
speciální syntézu polymerů	4	2
lékařský zákrok *	3	6
způsob výroby oční protézy	6	8
nezodpovězeno	0	1
8. Jaký je rozdíl mezi oční protézou a bionickým okem?		
žádný, jedná se o synonyma	1	2
bionické oko je, na rozdíl od oční protézy, schopno zprostředkovávat zrak *	3	5
bionické oko je, na rozdíl od oční protézy, pohyblivé	9	10

(pokračování na str. 52)

(Tabulka 3b – pokračování ze str. 51)

9. Myslíte si, že pacient s oční protézou může obsluhovat motorové vozidlo?		
ano	1	0
ano, po řádných testech schopností *	8	13
ne, nikdy	4	4

Tabulka 3c shrnuje odpovědi na otázky č. 10 – č. 15. Tyto otázky byly zjišťovacího charakteru a řešily možné důsledky zařazení výuky problematiky očních protéz do středoškolské výuky. Současně byly zaměřeny na integraci studentů s oční protézou do školní třídy a na reakce respondentů při hypotetických situacích.

Z výsledku otázky č. 10 lze vyvodit, že u obou skupin studentů převládá lhostejnost k reakci okolí na vlastní hypotetické postižení. U otázky č. 11 se nadpoloviční počet studentů z obou skupin domnívá, že by učitel měl o problému svého žáka vědět automaticky – např. z údajů ve třídní knize.

U otázky č. 12 drtivá většina studentů chemického semináře (77 %) nedoporučuje výuku problematiky očních protéz na žádném typu nezdravotnických středních škol. Studenti humanitního semináře by naopak výuku uvítali i na běžné střední škole v 47 % a pouze na víceletém gymnáziu v 18 %.

Otázky č. 13 – č. 15 se zabývaly hypotetickými reakcemi studentů při výuce o vlastním (hypotetickým) postižení. Negativní reakce na probírání dané látky se v součtu týkala 9 studentů z 30 dotázaných, ale 12 studentů z 30 vnímá jako reálnou možnost, že by je učitel při výkladu jmenovitě uvedl jako názorný příklad.

Otázka č. 15 vykazuje větší rozdíl mezi studenty obou seminářů, co se týče hypotetické ztráty oka a následného ovlivnění vztahů v kolektivu. Žádné změny ve vztazích se neobává 46 % studentů chemického semináře, ale pouze 18 % studentů literárního semináře.

Tabulka 3c: Výsledky pedagogicko-psychologické části dotazníku

10. Kdybyste Vy sám/sama měl/a oční protézu, tak...		
bych nechtěl/a, aby to věděli spolužáci ani učitelé	0	1
bych nechtěl/a, aby to věděli spolužáci	1	4
by mi bylo jedno, jestli to někdo zjistí	12	12
11. Myslíte si, že má význam, aby učitel automaticky (například z třídní knihy) věděl o postižení svého žáka?		
ano, může mu poté uzpůsobit výuku	7	10
ani ne, žák může požádat o pomoc sám z vlastní vůle	3	6
ne	3	1
12. Myslíte si, že by se problematika očních protéz měla probírat na střední škole bez zdravotnického zaměření?		
ano, ale pouze na víceletých gymnáziích	3	3
ano	0	8
ne	10	5
nezodpovězeno	0	1
13. Kdybyste měl/a nějaké postižení nebo nemoc a tato problematika by se probírala například na biologii, jaké byste měl/a pocity?		
byl/a bych rád/a, aspoň mi spolužáci porozumí	5	2
bylo by mi to jedno	4	9
bylo by mi to nepříjemné	4	5
nezodpovězeno	0	1
14. Vnímáte jako reálnou hrozbu, že by učitel uvedl jako příklad pacienta s touto nemocí právě Vás?		
ano	5	7
ne	8	10

(pokračování na str. 54)

(Tabulka 3c – pokračování ze str. 53)

15. Myslíte si, že by ztráta oka nebo zraku na jednom oku mohla nějak ovlivnit Vaše vztahy v kolektivu?		
ano, pozitivně – spolužáci by na mě byli milí a pomohli by mi	0	4
ano, negativně – bojím se, že by se mi spolužáci smáli, nebo mě litovali	2	5
ano, negativně – cítil/a bych se vyloučený/á z kolektivu	4	4
ano, pozitivně i negativně – spolužáci by na mě byli milí a pomohli by mi, ale bojím se, že by se mi smáli, nebo mě litovali	1	0
ano, negativně - bojím se, že by se mi spolužáci smáli, nebo mě litovali, a současně bych se cítil/a vyloučený/á z kolektivu	0	1
ne	6	3

6. DISKUSE

Adsorbované množství lysozymu nebylo metodou přímého stanovení proteinů spektrofotometricky detekováno. Vzhledem k experimentálním podmínkám lze uvažovat o ztrátách proteinu způsobenými jeho adsorpcí na jiný povrch, než na cílovou destičku z PMMA, konkrétně na nízkohustotní polyethylen. Hydrofobní charakter povrchu experimentální destičky poměrně znesnadňoval jeho omytí menším objemem než 1500 µl, což snížilo citlivost stanovení.

V rámci pilotního šetření provedeném na Gymnáziu Jana Nerudy, škole hlavního města Prahy, byly v problematice očních protéz testovány dvě skupiny studentů. Studenti chemického semináře uváděli, že se s problematikou alespoň okrajově setkali ve 38 % odpovědí, oproti humanitněji zaměřeným studentům, kteří se alespoň okrajově s problémem setkali jen v 29 %. Žádný student neuvedl, že by byl s problematikou podrobněji obeznámen.

Studenti chemického semináře lépe zodpověděli otázky týkající se pojmu anaplastologie a tvaru oční protézy. V otázkách na funkčnost bionického oka a možnosti řízení motorového vozidla byli studenti obou skupin srovnatelní. Překvapivá byla úspěšnost studentů literárního semináře u vysvětlení pojmu *eviscerace*. Pojem správně přiřadilo 35 % studentů, zatím na semináři z fyzikální chemie tak učinilo pouze 23 %. Zvýšená úspěšnost odpovědi studentů literárního semináře nejspíše nevychází z medicínských znalostí (které by se musely promítnout i do předešlých otázek), ale spíše z interdisciplinárních vztahů. Pojem *eviscerate* v angličtině odpovídá českému *vykuchat*. Tato hypotéza vychází z konzultací s respondenty v rámci předvýzkumu mezi studenty vysokých škol.

V pedagogicko-psychologických otázkách se studenti obou seminářů většinou shodují. Jen studenti literatury by uvítali výuku problematiky na SŠ v 47 %, zatímco studenti chemického semináře by ji v 77 % nedoporučili.

V rámci vývoje vztahů ve třídě po ztrátě oka se jejich ovlivnění neobává 46 % studentů chemického semináře a pouze 18 % studentů literárního semináře. Zajímavé je, že všichni respondenti literárního semináře, kteří se změny vztahů neobávali, byli muži.

7. ZÁVĚR

Tato bakalářská práce byla zaměřena na tvorbu uceleného textu o problematice očních protéz v českém jazyce a na jeho obohacení o diskusi problematiky adsorpce proteinů na syntetický materiál, rovněž v českém jazyce.

V rámci ověření odolnosti polymethylmethakryátové destičky medicínské kvality vůči adsorpci lysozymu byl navržen vlastní experiment. Adsorbované množství proteinu bylo z destičky omyto a absorpční spektra získaného roztoku byla proměřena na spektrofotometrech NanoVue Plus, Specord 250 Plus a Spektromom 195 D. Adsorpce lysozymu na polymethylmethakryátovou destičku neproběhla ve spektrofotometricky detekovatelném množství. Tato skutečnost odpovídá předběžným závěrům učiněným na základě osobní konzultace s výrobcem protéz, pacientem a četby odborné literatury. Ve snaze protein koncentrovat do co nejmenšího objemu byla absorpční spektra měřena na přístroji NanoVue Plus v objemu 3 μl a optickou drahou 0,5 mm. Podle výsledků přímého stanovení proteinu byla adsorpce lysozymu na povrchu destičky z PMMA menší než limit detekce daný kalibrační závislostí a tedy menší než 5,37 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$.

Druhý výzkumný záměr této práce bylo orientační prověření znalostí studentů gymnázia v oblasti očních protéz. Studenti chemického semináře, kteří se profilovali spíše přírodovědným směrem, vykazovali konstantně lepší povědomí o problematice, než studenti literárního semináře profilující se spíše humanitním směrem. Výjimkou ve znalostním testu byla otázka na vysvětlení pojmu eviscerace, kterou lépe zodpověděli studenti humanitního semináře. Vytvořenou hypotézu o lepší informovanosti přírodovědně zaměřených žáků se vzhledem k nízkému počtu respondentů nepodařilo potvrdit ani vyvrátit na zobecnitelné úrovni. Podle výsledků pedagogicko-psychologických otázek v pilotním šetření lze výuku problematiky očních protéz na střední škole spíše nedoporučit.

8. SEZNAM LITERATURY

1. *MedicineNet.com – Medical Definition of Anaplastology* [online], © 1996-2018. Aktualizováno 6. září 2016 [cit. 2018-03-10] Dostupné z: <https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=24556>
2. *Merriam-Webster Dictionary.com – Anaplastology* [online], © 2018. [cit. 2018-03-10] Dostupné z: <https://merriam-webster.com/medical/anaplastology>
3. RAIZADA, K.; RANI, D. Ocular prosthesis. *Contact Lens & Anterior Eye*, 2007, vol. 30, p. 152-162
4. ZUBERBÜHLER, B.; HAEFLIGER, E.; MENAPACE, R.; NEUHANN, T. *Kataraktchirurgie*. Berlín: Springer, 2008. ISBN 978-3-540-79944-3.
5. KRACHMER, J. H.; MANNIS, M. J.; HOLLAND, E. (eds.). *Cornea: Fundamentals Diagnosis Managment*. Philadelphia: Elsevier Mosby, 2011. ISBN 978-0-323-06387-6.
6. DYLEVSKÝ, I. Funkční anatomie, Praha: Grada Publishing ,a.s., 2009. ISBN: 978-80-247-3240-4.
7. MONTALBO, J. D. U. S. Patent 7,130,693 B1, 2006.
8. DÜRROVÁ, A. *Oční protetika – indikace k užití očních protéz*. Brno, 2007. Diplomová práce. Katedra optometrie a ortoptiky, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita. Vedoucí práce: Mgr. Sylvie Petrová.
9. KLUSOŇOVÁ, D. *Oční protézy*. Brno, 2015. Bakalářská práce. Katedra optometrie a ortoptiky, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita. Vedoucí práce: Mgr. Sylvie Petrová.
10. JANEWAY, CH. A. Jr.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. J. *Immunobiology, 5th eddition. The Immune System in Health and Disease*. New York: Garland Science, 2001. ISBN: 0-8153-3642-X.
11. MOSHFEGHI, D. M.; MOSHFEGHI, A. A.; FINGER, P. T. Enucleation. *Survey of Ophthalmology*, 2000, vol. 44, p. 277-301
12. HUANG, D.; YU, Y.; LU, R.; YANG, H.; CAI, J. A modified evixceration technique with scleral quadrisection and porous polyethylene implantation. *Am. J. Ophthalmol.*, 2009, vol. 147, p. 924-8.
13. *Asprion.at – Asprion Augenprothetik* [online], © Nikolaus Kerbl. [cit. 2018-03-10] Dostupné z: www.asprion.at
14. COLEN, T. P.; PARIDAENS, D. A.; LEMIJ, H. G.; MOURITS, M. P.; VAN DEN BOSCH, W. A. Comparison of artificial eye amplitudes with acrylic and hydroxyapatite spherical enucleation implants. *Ophthalmology*, 2000, vol. 107, p. 1889-94.
15. CUSTER, P. L.; KENNEDY, R. H.; WOOG, J. J.; KALTREIDER, S. A.; MEYER, D. R. Orbital implants in enucleation surgery: a report by the American Academy of Ophthalmology. *Ophthalmology*, 2003, vol. 110, p. 2054-61.
16. CHEN, Y. H.; CUI, H. G. High density porous polyethylene material (Medpor) as an unwrapped orbital implant. *Journal of Zhejiang University. Science. B.*, 2006, p. 679-82.
17. SHOME, D.; HONAVAR, S. G.; RAIZADA, K.; RAIZADA, D. Implant and prosthesis movement after enucleation: a randomized controlled trial. *Ophthalmology*, 2010, vol. 107, p. 1638-44.

18. EYSEL, U. T.; SCHWEIGART, G.; MITTMANN, T.; EYDING, D.; QU, Y.; VANDESANDE, F.; ORBAN, G.; ARCKENS, L. Reorganization in the visual cortex after retinal and cortical damage. *Restorative neurology and neuroscience*, 1999, vol. 15, no. 2-3, p. 153-64.
19. DARSOVÁ, D. „Kurz oční protézy – 2011“. In iazt.cz [online]. Praha: Asociace zrakových terapeutů o. s., 2011, [cit. 2018-03-11] Dostupné z: www.iazt.cz
20. VOCÍLKA, O. *Návrh a výroba oční protézy 3D tiskem*. Brno, 2017. Bakalářská práce. Fakulta strojního inženýrství, Vysoké učení technické v Brně. Vedoucí práce: doc. Ing. Josef Sedlák, Ph.D.
21. *MSD Manuals.com – Effects of aging on the eyes* [online], © 2018. [cit. 2018-03-18] Dostupné z: <https://www.msdmanuals.com/home/eye-disorders/biology-of-the-eyes/effect-of-aging-on-the-eyes>
22. MLEZIVA, J. *Polymery – výroba, struktura, vlastnosti a použití*. Praha: Sobotáles, 1993. ISBN 80-901570-4-1.
23. Návod k použití přikládaný k pryskyřici Superpont® od společnosti SpofaDental. Datum poslední revize 28. 2. 2006.
24. TOŠOVSKÁ, D. *Oční protézy*. Brno, 2007. Bakalářská práce. Katedra optometrie a ortoptiky, Lékařská fakulta, Masarykova univerzita. Vedoucí práce: MUDr. Jan Richter.
25. Návod k použití přikládaný k pryskyřici Meliodent® Heat Cure od společnosti Heraeus Kulzer GmbH. Datováno: 02. 2010.
26. DUCHÁČEK, V. *Polymery – výroba, vlastnosti, zpracování, použití* (3. vydání). Praha: VŠCHT, 2015. ISBN: 978-80-7080-788-0.
27. PROKOPOVÁ, I. *Makromolekulární chemie* (2. vydání). Praha: VŠCHT, 2012. ISBN: 978-80-7080-662-3.
28. BROŽEK, J. a kol. *Laboratorní cvičení z makromolekulární chemie*. Praha: VŠCHT, 2016. ISBN: 978-80-7080-945-7.
29. MCMURRY, J. *Organická chemie* (6. vydání). Praha: VŠCHT, 2007. ISBN: 978-80-7080-637-1.
30. HENCH, L. L. Bioceramics: from concept to clinic. *J. Am. Ceram. Soc.*, 1991, vol. 74, no. 7, p. 1487-1510.
31. CHEN, H.; YUAN, L.; SONG, W.; WU, Z.; LI, D. Biocompatible polymer materials: Role of protein-surface interactions. *Progress in Polymer Science*, 2008, vol. 33, p. 1059-1087.
32. KOSTINA, N. *Novel avenues for the preparation of antifouling scaffolds for tissue engineering*. Praha, 2015. Disertační práce. Katedra fyzikální a makromolekulární chemie, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Karlova. Vedoucí práce: Ing. Jiří Michálek, CSc.
33. OSTUNI, E.; CHAPMAN, R. G.; HOLMLIN, R. E.; TAKAYAMA, S.; WHITESIDES, G. M. A survey of structure-property relationships of surfaces that resist the adsorption of protein. *Langmuir*, 2001, vol. 17, p. 5605-20.
34. LEE, K. Y.; MOONEY, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering. *Chemical Reviews*, 2001, vol. 101, no. 7, p. 1869-1879.
35. HAMPL, F.; RÁDL, S.; PALEČEK, J. *Farmakochemie* (3. upravené vydání). Praha: VŠCHT, 2015. ISBN: 978-80-7080-875-7.
36. KURTZ, S. M. *UHMWPE Biomaterials Handbook: Ultra High Molecular Weight Polyethylene in Total Joint Replacement and Medical Devices*. Academic Press, 2009. ISBN: 978-0-12-374721-1.

37. GREEN, T. R.; FISHER, J.; STONE, M.; WROBLEWSKI, B. M.; INGHAM, E. Polyethylene particles of a „critical size“ are necessary for the induction of cytokines by macrophages in vitro. *Biomaterials*, 1998, vol. 19, n. 2297-2302.
38. ZOLOTAREROVÁ, J.; HUDEČEK, J.; ŠPUNDOVÁ, M.; ENTLICHER, G. Binding of proteins to ultra high molecular weight polyethylene wear particles as a possible mechanism of macrophage and lymphocyte activation. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2010, vol. 95A, p. 950-955.
39. TANAKA, M.; MOTOMURA, T.; KAWADA, M.; ANZAI, T.; KASORI, Y.; SHIROYA, T.; SHIMURA, K.; ONISHI, M.; MOCHIZUKI, A. Blood compatible aspects of poly(2-methoxyethylacrylate) (PMEA) – relationship between protein adsorption and platelet adhesion on PMEA surface. *Biomaterials*, 2000, vol. 21, p. 1471-1481.
40. JELÍNEK, J.; ZICHÁČEK, V. *Biologie pro gymnázia*. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2000. ISBN: 80-7182-107-1.
41. *Sharecare.com – How many types of tears are there?* [online], © 2010-2018. [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: www.sharecare.com/health/eye-vision-healthy/how-many-types-of-tears
42. ČIHÁK, R. *Anatomie 3* (Třetí, upravené a doplněné vydání). Praha: Grada Publishing, a.s., 2016. ISBN: 978-80-247-5636-3.
43. SVITOVA, T. F.; LIN, M. C. Dynamic interfacial properties of human tear-lipid films and their interactions with model-tear proteins in vitro. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2016, vol. 233, p. 4-24.
44. *Collins Street Optometrists – Understanding the Tear Film and Dry Eye*. [online], © 2015 Collins Street Optometrists. [cit. 2018-03-26]. Dostupné z: www.collinsoptometrists.com.au/dry-eye-clinic/understanding-the-tear-film-and-dry-eye/
45. ALTMAN, P.L.; DITTMER, D. S. *Biology Data Book- Volume III*. Bethesda: Federation of American Societies for Experimental Biology, 1974. ISBN: 0-913822-08-6.
46. ROLANDO, M.; ZIERHUT, M. The ocular surface and tear film and their dysfunction in dry eye disease. *Survey of Ophthalmology*, 2001, vol. 45, p. S203-S210.
47. DE PINHO TAVARES, F.; FERNANDES, R. S.; BERNARDES, T. F.; BONFIOLI, A. A.; SOARES, E. J. C. Dry eye disease. *Seminars in Ophthalmology*, 2010, vol. 25, no. 3, p. 4-93.
48. KIM, S. E.; YOON, J. S.; LEE, S. Y. Tear Measurement in Prosthetic Eye Users with Fourier-Domain Optical Coherence Tomography. *Am. J. Ophthalmol.*, 2010, vol. 149, no. 4, p. 602-607.
49. BILEJ, M. Mucosal Immunity in Invertebrates. *Mucosal Immunology*, 2015, vol. 1, p. 135-144.
50. JURČAGA, M. *Fyziologie slzného aparátu, složení a funkce slz*. Brno, 2014. Bakalářská práce. Lékařská fakulta, Masarykova univerzita. Vedoucí práce: MUDr. Petr Kus.
51. MURRAY, R. K.; GRANNER, D. K.; MAYES, P. A.; RODWELL, V. W. *Harperova Biochemie*. Praha: Nakladatelství a vydavatelství H + H, 2002. ISBN: 80-7319-013-3.
52. VOET, D.; VOET, J. *Biochemistry*. John Wiley and Sons. Inc. 2004. ISBN: 0-471-19350-x.
53. JÍLEK, P. *Imunologie, stručně, jasně, přehledně*. Praha: Grada Publishing, a.s., 2014. ISBN: 978-80-247-4822-1.

54. KODÍČEK, M.; VALENTOVÁ, O.; HYNEK, R. *Biochemie – chemický pohled na biologický svět*. Praha: 2015. VŠCHT. ISBN: 978-80-7080-927-3.
55. FARNAUD, S.; EVANS, R. W. Lactoferrin – a multifunctional protein with antimicrobial properties. *Mol. Immunol.*, 2003, vol. 40, no. 7, p. 395-405.
56. MCKOWN, R. L.; COLEMAN FRAZIER, E. V.; ZADROZNY, K. K.; DELEAULT, A. M.; RAAB, R. W.; RYAN, D. S.; SIA, R. K.; LEE, J. K.; LAURIE, G. W. A cleavage-potential fragment of tear lacritin is bactericidal. *J Biol Chem.*, 2014, vol. 289, no. 32, p. 22172-82.
57. MC LEAN, M. Adapting to loss an eye. *BC Medical Journal*, 2011, vol. 53, no. 10, p. 527.
58. KASHKOULI, M. B.; ZOLFAGHARI, R.; ES'HAGHI, A.; AMIRSARDARI, A.; ABTAHI, M. B.; KARIMI, N.; ALEMZADEH, A.; AGHAMIRSALIM, M. Tear Film, Eye Drainage System, and Eyelid Findings in Subjects With Anophthalmic Socket Discharge. *Am. J. Ophthalmol.*, 2016, vol. 165, p. 33-38.
59. Život bez oka – web o očních protézách [online], © 2012. [cit. 2018-04-02]. Dostupné z: <https://www.zivotbezoka.cz>.
60. OSBORN, K. L.; HETTLER, D. A survey of recommendations on the care of ocular prostheses. *Optometry*, 2010, vol. 81, p. 142-145.
61. BONAQUE-GONZÁLEZ, S.; AMIGÓ, A.; RODRÍGUEZ-LUNA, C. Recommendations for post-adaption care of an ocular prosthesis: A review. *Contact Lens & Anterior Eye*, 2015, vol. 38, p. 397-401.
62. VASQUEZ, R. J.; LINBERG, J. V. The anophthalmic socket and the prosthetic eye. A clinical and bacteriologic study. *Ophthalm. Plast. Reconstr. Surg.*, 1989, vol. 5, p. 277-80.
63. PARR, G. R.; GOLDMAN, B. M.; RAHN, A. O. Postinsertion care of the ocular prosthesis. *J. Prosthet. Dent.*, 1983, p. 220-224.
64. MALHOTRA, R. Ocular prostheses: not quite an eye for an eye. *Br. J. Ophthalmol.*, 2013, vol. 97, p. 383-85.
65. VÁGNEROVÁ, M. *Obecná psychologie: Dílčí aspekty lidské psychiky a jejich orgánový základ*. Praha: Karolinum, 2016. ISBN: 978-80-246-3268-1.
66. DENEROVÁ, T. *Možnosti integrované výchovy dětí se zrakovým postižením v předškolním věku*. Praha, 2007. Diplomová práce. Katedra speciální pedagogiky, Univerzita Karlova. Vedoucí práce: PhDr. Eva Mrkosová, CSc.
67. KRAJHANZL, A.; HLADÍK J. a kol. *Biochemické metody. Návod k pokročilým praktickým cvičením*. Praha: Univerzita Karlova nakladatelství Karolinum, 1991.
68. *ThermoFisher.com – Overview of Protein Assays Methods* [online], © 2012. [cit. 2018-04-15] Dostupné z: <https://www.thermofisher.com/content/sfs/brochures/TR0068-Protein-assay-compatibility.pdf>
69. WALKER, J. M. *The Protein Protocols Handbook, 2nd Edition*. Totowa: Humana Press Inc., 2009. ISBN: 978-1-59745-198-7.
70. HARRIS, D. A.; BASHFORD, C. L. *Spectrophotometry and spectrofluorimetry a practical approach*. Oxford: IRL Press Limited, 1987. ISBN: 0-947946-69-1.
71. GIDDENS, A. *Sociologie*. Praha: Argo, 2013. ISBN: 978-80-257-0807-1.
72. JEŘÁBEK, H. *Úvod do sociologického výzkumu*. Praha: Karolinum, 1993. ISBN: 80-7066-662-5.

73. MUŽÍKOVÁ, B. *Postoje žáků základních škol k integraci žáků se sluchovým postižením*. České Budějovice, 2014. Diplomová práce. Katedra pedagogiky a psychologie, Pedagogická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce: PaedDr. Erika Nehrerová, Ph.D.
74. KOUDELKOVÁ, A. *Integrace dětí se zrakovým postižením do hodin tělesné výchovy*. Praha, 2013. Bakalářská práce. Fakulta tělesné výchovy a sportu, Univerzita Karlova. Vedoucí práce: Mgr. Eva Prokešová.
75. OBERREITEROVÁ, M. *Mentální anorexie a míra vybraných rizikových faktorů podněcující její vznik u žáků nižšího gymnázia*. České Budějovice, 2009. Diplomová práce. Katedra pedagogiky a psychologie, Pedagogická fakulta, Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích. Vedoucí práce: Mgr. Renata Jandová.
76. *natur.cuni. cz – Návodů k praktickým úlohám pro studenty NANALD* [online], © 2017. [cit. 2018-04-27] Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/analchem/pprakt/navody.pdf>
77. PYTELA, O. *Chemometrie pro organické chemiky*. Pardubice: Univerzita Pardubice, 2003. ISBN: 80-7194-539-0.